

**Quantitative Mikrozirkulationsanalyse
im amelanotischen Hamstermelanom A-Mel-3**

Disbui. München

1988

Alwin Eduard Goetz





Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554827_0016

Aus dem Institut für Chirurgische Forschung
der Ludwig-Maximilians-Universität München,
Klinikum Großhadern

Vorstand: Prof. Dr. Dr. h.c. W. Brendel

**Quantitative Mikrozirkulationsanalyse
im amelanotischen Hamstermelanom A-Mel-3**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades in der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Alwin Eduard Goetz
Bayreuth/Bayern

1987

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Berichterstatter: 1. Prof. Dr. med. Dr. h.c. W. Brendel
2. Prof. Dr. med. M. Wahl

Mitberichterstatter: 1. Prof. Dr. med. H. Rabes
2. Prof. Dr. med. Dr. phil. J. Ring

Dekan: Prof. Dr. med. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 21.01.88

INHALTSVERZEICHNIS

I. EINLEITUNG

1.	Vorbemerkungen	1
2.	Tumormikrozirkulation	3
3.	Zielsetzung und Fragestellung	5

II. METHODIK

1.	Versuchstiere und Versuchstierhaltung	7
2.	Entwicklung des transparenten Rückenhautkammermodells am Syrischen Goldhamster	8
2.1.	Chronische transparente Kammermodelle für Mikrozirkulationsstudien - Literaturübersicht	8
2.2.	Vorversuche	9
2.3.	Anforderungen an ein neues Kammermodell	10
2.4.	Modell der transparenten Rückenhautkammer am Syrischen Goldhamster	11
3.	Präparation der Versuchstiere	11
3.1.	Vorbereitung der transparenten Rückenhautkammer	11
3.2.	Implantation der Rückenhautkammer	13
3.3.	Implantation der Dauerkatheter	16
4.	Gefäßversorgung und Angioarchitektur der Hamsterhautkammerpräparation	17
5.	Definition und Auswahlkriterien einer intakten Mikrozirkulationspräparation	21
6.	Tumorzelltransplantation	24
6.1.	Tierpassage	24

6.2.	Kultur der Tumorzellen	26
6.3.	Vorbereitung der Tumorzellen zur Implantation	27
6.4.	Tumorzellimplantation	27
7.	Fluoreszenzmarkierung von Erythrozyten	28
8.	Versuchsablauf und Versuchsgruppen	30
8.1.	Versuchsprotokoll zur quantitativen Analyse der Mikrozirkulation	30
8.2.	Ablauf der täglichen Einzeluntersuchungen	30
8.3.	Versuchsgruppen	32
9.	Meßmethoden und gemessene Parameter	33
9.1.	Tägliche Gewichtskontrolle der Versuchstiere	33
9.2.	Makroskopische Photodokumentation	33
9.3.	Bestimmung des Tumorwachstums	34
9.4.1	Arterielle Blutgasanalysen	34
9.4.2.	Hämatokritmessung	34
9.5.	Makrohämodynamische Messungen	35
9.6.1.	Aufbau des Mikrozirkulationsmeßplatzes	35
9.6.1.1.	Aufnahmeeinheit	36
9.6.1.2.	Auswerteeinheit	39
9.6.2.	Videomikroskopie	41
9.6.3.	Mikrohämodynamische intravitalmikroskopische Messungen, gemessene und errechnete Parameter	42
9.6.3.1.	Messung der Blutzellgeschwindigkeit	42
9.6.3.1.1.	Historische Übersicht	42
9.6.3.1.2.	Zweischlitztechnik - "dual-slit-technique"	43
9.6.3.1.3.	Meßprinzip	44
9.6.3.1.4.	Zweifenstertechnik - "dual-window-technique" Einfluß von Sensorgröße und Sensorabstand	48
9.6.3.1.5.	Eichung des Meßsystems	48
9.6.3.1.6.	Diskussion der Meßmethodik	50
9.6.3.1.7.	Wertung der verwendeten Geschwindigkeitsmeß- methoden	52
9.6.3.2.	Quantifizierung der Gefäßdurchmesser	53

9.6.3.3.	Berechnung des segmentalen Volumenflusses	54
9.6.3.4.	Messung des Mikrohämatokrites	54
9.6.3.4.1.	Bestimmung der markierten Erythrozytenfraktion	54
9.6.3.4.2.	Fließgeschwindigkeitsmessung	55
9.6.3.4.3.	Berechnung des Erythrozytenflusses	56
9.6.3.4.4.	Quantitative Erfassung der Gefäßdurchmesser	56
9.6.3.4.5.	Berechnung des Mikrohämatokrites	56
9.6.3.5.	Morphometrische Messungen	57
9.6.3.5.1.	Messung der Kapillarlängen	57
9.6.3.5.2.	Berechnung der Kapillardichte	57
9.6.3.5.3.	Berechnung der Kapillaroberfläche	59
9.6.3.6.	Untersuchung der Permeabilität für Makromoleküle	59
9.6.3.7.	Vorversuche zum Einfluß der Beleuchtung ohne und mit Fluoreszenzmarker	60
9.7.	Messung des regionalen Gewebeoberflächen- sauerstoffpartialdruckes	61
9.7.1.	Meßprinzip	61
9.7.2.	Mehrdrahtoberflächenelektrode (MDO)	62
9.7.3.	Vorbereitung und Eichung der Mehrdrahtober- flächenelektrode	66
9.7.4.	Eichung	66
9.7.5.	Messung in der Hautkammer	67
9.7.6.	Datenaufnahme und -verarbeitung	67
9.7.7.	pO_2 -Histogramm	70
9.7.8.	Anmerkung zur statistischen Verarbeitung von pO_2 - Histogrammen	71
9.8.	Histologie und Elektronenmikroskopie	72
9.9.	Erfassung des Antransportes und der Verweildauer fluoreszierender Substanzen durch digitale Bildver- arbeitung	73
10.	Darstellung der Meßergebnisse und statistische Verarbeitung	77

III. ERGEBNISSE

1.	Makrohämodynamische Veränderungen	78
1.2.	Verhalten der Blutgase und des pH-Wertes	78
1.3.	Mikroskopische und makroskopische Befunde	78
1.3.1.	Versuchstiere ohne Tumor (Gruppe I)	78
1.3.2.	Tumortragende Tiere	81
1.3.2.1.	Tumorentstehung und Tumorgewebe (Gruppe II)	81
1.3.2.2.	Tumorumliegendes Gewebe (Gruppe III)	83
1.4.	Tumorwachstum	84
2.	Mikrohämodynamische Veränderungen	88
2.1.1.	Transversalarteriolen	88
2.1.2.	Terminale Arteriolen	89
2.1.3.	Präkapillaren	89
2.1.4.	Kapillaren	96
2.1.5.	Postkapillaren	97
2.1.6.	Sammelvenolen	102
2.1.7.	Venolen	103
2.1.8.	Übersicht über die mikrohämodynamischen Veränderungen	103
2.2.1.	Veränderungen der Kapillarlängen	108
2.2.2.	Kapillardichte	108
2.2.3.	Kapillardichte der erythrozytenperfundierten Kapillaren	109
2.2.4.	Anteil der nicht perfundierten Kapillaren	116
2.2.5.	Kapillaroberfläche	117
2.2.6.	Mikrohämatokrit	122
2.3.	Verhalten des Gewebeoberflächen- pO_2	127
2.3.1.	Gewebeoberflächen- pO_2 des subkutanen Hautmuskels	127
2.3.2.	Gewebeoberflächen- pO_2 des amelanotischen Hamstermelanoms A-Mel-3	127
2.3.3.	Gewebeoberflächen- pO_2 des tumorumliegenden Gewebes	130

2.3.4.	Gewebeoberflächen- pO_2 - Messungen - Übersicht	130
2.4.	Vergleich mikrozirkulatorischer Messungen im Tumorzentrum und im Tumorrandgebiet	134
2.4.1.	Mikrohämodynamik	134
2.4.2.	Kapillardichte, Anteil nichtperfundierter Kapillaren und Gewebeoberflächen- pO_2	134
3.	Permeabilität für Makromoleküle	135
4.	Histologische und elektronenmikroskopische Untersuchungen	141
5.	Anreicherung von Fluorochromen in Tumor- und Normalgewebe	156
5.1.	Selektive Tumordarstellung durch Doppelindikatortechnik und digitale Bildsubtraktion - Ein neues diagnostisches Prinzip	157

IV. DISKUSSION

1.	Methodik	164
1.1.	Quantitative Videomikroskopie	166
1.1.1.	Fluoreszenzvideomikroskopie	166
1.1.2.	Geschwindigkeitsmessung	168
1.1.3.	Gefäßdurchmesser	169
1.2.	Quantifizierung des Mikrohämatokrites	170
1.3.	Berechnung der Kapillardichte	174
1.4.	Erfassung der makromolekularen Permeabilität	175
1.5.	Messungen des Gewebeoberflächen- pO_2	176
2.	Das transparente Hautkammermodell am Syrischen Goldhamster - eine physiologische Mikrozirkulationspräparation	178
3.	Besonderheiten der Tumormikrozirkulation im Frühstadium des Tumorwachstums	195

4.	Mikrozirkulation im tumorumliegenden Gewebe im Frühstadium des Tumorwachstums	207
5.	Erfassung des Antransportes fluoreszeierender Substanzen - ein Modell zur Überprüfung des Antransportes von Chemotherapeutika	210
6.	Klinische Bedeutung der Meßergebnisse	212
V. ZUSAMMENFASSUNG UND SCHLUßFOLGERUNG		216
VI. LITERATUR		224
VII. BISHER VERÖFFENTLICHTE TEILASPEKTE DIESER ARBEIT		282
VIII. ABSCHLIEßENDE BEMERKUNGEN		285
IX. LEBENS LAUF		288

I. EINLEITUNG

1. Vorbemerkungen

Nach Schätzungen der Weltgesundheitsorganisation (WHO) starben im Jahr 1975 etwa 6 Millionen Menschen an Krebs. Damit ist der Krebs bei Personen, die das 5. Lebensjahr bereits überschritten haben, die dritthäufigste Todesursache weltweit (Hanley, 1986), in Industriestaaten wie der Bundesrepublik Deutschland (BRD) und den Vereinigten Staaten (USA) jedoch bereits die zweithäufigste (Carter et al., 1982). Die Krebsmortalität in der BRD beträgt für Männer 176 und für Frauen 132 pro Jahr und 100.000 Einwohner und die Obduktionsstatistiken zeigen, daß sich jeder 4. bis 5. Todesfall unmittelbar auf einen bösartigen Tumor zurückführen läßt (Sandritter, 1981).

Der Begriff des Krebses geht auf das von Hippokrates (460 - 377 v. Chr.) geprägte Wort 'karkinos' zurück und wird derzeit klinisch synonym für Karzinom, Kanzer und maligner Tumor benutzt. In Anlehnung an den Begriff des Tumors wird der Krebs definiert als "maligne entartete, abnorme Gewebsmasse, die durch eine autonome, progressive und überschüssende Proliferation körpereigener Zellen entsteht" (Sandritter, 1981).

Im Kampf gegen den Krebs steht heute neben der zunehmenden Betonung der Primärprävention, z.B. der Verminderung von Bedingungen, die die Krebsentstehung begünstigen, wie etwa Rauchen, chemische Noxen, Strahlen etc., die sog. Sekundär- und Tertiärprävention, d.h. die Früherkennung des Krebses, bzw. eine differenzierte Tumorthherapie im Vordergrund (Eddy, 1986; Hanley, 1986).

Hier steht den enormen Fortschritten in der radiologischen, biochemischen und immunologischen Diagnostik eine unzureichende Entwicklung in der Tumorthherapie gegenüber. Jedoch sind auch auf dem Gebiet der Krebsbehandlung grundlegende Veränderungen nicht zu übersehen. War noch vor ein bis zwei Jahrzehnten die Reihenfolge lokale Chirurgie, regionale Radiotherapie und



Chemotherapie als Behandlungsregime vorherrschend, so findet heute in zunehmendem Maße eine tumorspezifische Variation dieses Prinzips Anwendung (Martz, 1985). So wird beispielsweise bei der Therapie von HNO-Tumoren mit der systemische Zytostase vor den chirurgischen Maßnahmen begonnen, und im Bereich der Urologie bei der Behandlung von Hodenteratomen durch eine vorrausgehende Chemotherapie zunächst versucht eine partielle Remission zu erzeugen und diese durch anschließende Chirurgie in eine Vollremission überzuführen. Hinzu kommen neue therapeutische Verfahren, wie z. B. die lokale Hyperthermie, die Photodynamische Therapie, die Kombination von Chemotherapie und Mikroembolisation mit Stärkemikrosphären etc.

Diese Verbesserungen von diagnostischen und auch therapeutischen Möglichkeiten und deren gezielte Anwendung und Anpassung an verschiedene Untergruppen maligner Tumoren ein- und desselben histologischen Typs macht die Indikationsstellung zur Tumorthherapie zu einer Materie, die heute nur noch wirklich erfahrene Onkologen beherrschen können, bzw. nahezu ausschließlich in Teamarbeit von Spezialisten verschiedener Fachdisziplinen bewältigt werden kann. Dieser Entwicklung wird in den Vereinigten Staaten in der Weise Rechnung getragen, daß bereits mehr als 2000 Ärzte eine spezielle Ausbildung zum "oncologist" erhalten haben. Die hierzulande noch vor wenigen Jahren vielfach vertretene Meinung, daß eine internistische, d.h. eine chemotherapeutische Krebstherapie schrittweise vereinfacht werden könnte, um sie zunehmend in die freie Praxis überzuführen, ist damit nicht mehr haltbar (Martz, 1985).

Zu diesem Wandel haben unter anderem neue Erkenntnisse aus verschiedenen Spezialdisziplinen der angewandten klinischen und der Grundlagenforschung beigetragen, z.B. aus der Physik und der Radiologie, der Tumorummunologie, der Tumorbilogie und der Biochemie. Demgegenüber haben, wie etablierten Lehrbüchern im deutschen und englischen Sprachraum zu entnehmen ist, neue Kenntnisse auf dem Gebiet der Tumorphysiologie weder in therapeutischer noch in diagnostischer Hinsicht entscheidende Berücksichtigung erfahren (Carter et al., 1982; Carter und Livingston, 1982; Holdener, 1985; Hünig et al., 1985; Senn, 1985). Aus klinischer Sicht wird der Tumor in der Regel noch immer als homogene Tumorzellmasse angesehen, d.h. die zellulärpatholo-

gische Sichtweise ist vorherrschend (Wenner, 1975; Hellmann und DeVita, 1982). Neue Kenntnisse der Besonderheiten des Mikromilieus von Tumoren und der nutritiven Tumordurchblutung spielen deshalb nach wie vor eine eher untergeordnete Rolle. Gerade für eine wirksame Chemotherapie muß jedoch der Funktionstüchtigkeit des Transportsystems, d.h. der Mikrozirkulation von Tumoren, entscheidende Bedeutung beigemessen werden. Das geringe Interesse an physiologisch bedeutsamen Parametern liegt zum Teil wohl auch daran, daß in einer Vielzahl der Untersuchungen zur Tumorphysiologie die Tumore häufig ebenso nur als homogene Einheit dargestellt wurden. Intratumorale regionale Unterschiede fanden nur in Ausnahmefällen Berücksichtigung und Veränderungen im Frühstadium wie auch im weiteren Verlauf des Tumorstadiums wurden nur sporadisch untersucht.

2. Tumormikrozirkulation

Der Nobelpreisträger AUGUST KROGH, einer der Pioniere auf dem Gebiet der Mikrozirkulation, bezeichnete das Kapillarbett als den wichtigsten Abschnitt des Kreislaufs, dem sowohl von Klinikern als auch von Theoretikern besondere Aufmerksamkeit entgegengebracht werden sollte (Krogh, 1922). Der Begriff der Mikrozirkulation, der erst dreißig Jahre später von ZWEIFACH (Zweifach, 1957) und von FULTON (Fulton, 1957) geprägt wurde, umfaßt nach H. MEESEN die "Dynamik der Durchblutung der kleinen Gefäße, der terminalen Strombahn, also den Bereich des Blutkreislaufes in den Geweben und Organen, in dem der Austausch der Gase, der Antransport der Nährsubstanzen und der Abtransport der Stoffe, die aus dem Stoffwechsel der Zellen, Gewebe und Organe anfallen, erfolgt" (Meesen, 1977).

Besonders dieser dynamische Aspekt wurde im Bereich der Tumormikrozirkulation bisher kaum untersucht und auch nicht exakt quantitativ analysiert. Dies muß umso mehr überraschen, da der Göttinger Pathologe RIBBERT bereits im Jahre 1904 in einer bemerkenswerten Arbeit das Gefäßsystem maligner Tumoren detailliert beschrieb (Ribbert, 1904). In der DMW vom 26.5.1904 berichtete er, daß die Neubildung von Gefäßen im Tumor meist von kapillärer

Natur und von der Beschaffenheit eines Endothelrohrs sei. Aus dieser unvollkommenen Struktur ergäbe sich zwangsläufig eine mangelhafte Funktion. Dementsprechend wären die Gefäße der Geschwülste bisweilen ausgesprochen dilatiert und zeigten kavernöse Umgestaltungen und aneurysmatische Ausbuchtungen.

Trotz dieser Kenntnisse beschränkten sich die Untersucher in der Folge meist auf sogenannte strukturelle Analysen, die sich jedoch weniger mit Strukturen im Sinne der Morphologie und vielmehr mit Musterbildungen, d.h. der Architektur von Mikrogefäßen auseinandersetzen (Goldmann, 1907; Williams, 1951; Kligerman und Henel, 1961; Urbach und Graham, 1962; Urbach, 1963; Warren und Shubik, 1966; Robert, 1967; Rhodin, 1967, 1968; Warren, 1967, 1970; Eddy und Casarett, 1973; Gimbrone et al., 1974; Yamaura und Sato, 1974; Warren, 1979a, 1979b; Hammersen et al., 1983). Die Einschränkung auf derartige Untersuchungen lag wohl nicht zuletzt an der bis dahin vorherrschenden Limitierung in der Methodik.

Mit der Entwicklung von Mikrotechniken wurde es dann schrittweise möglich, Messungen von physiologisch bedeutsamen Parametern direkt im Tumor durchzuführen. Durch Messungen mit Stichelektroden konnte gezeigt werden, daß im Tumorzentrum Hypoxie, Azidose, ein niedriger Glukosegehalt und hohe Laktatspiegel vorliegen. (Urbach und Noell, 1969; Reinhold, 1971; Gosalvez et al. 1972a, 1972b; Vaupel, 1977; Reinhold et al., 1977; Vaupel et al., 1979; Reinhold, 1979; Müller-Klieser et al., 1980, 1981; Vaupel et al., 1981; van den Berg et al., 1982; Müller-Klieser und Vaupel, 1983). Darüberhinaus wurde berichtet, daß der interstitielle Raum in Tumoren im Vergleich zum Normalgewebe um mehr als 100 % vergrößert ist (Gullino et al., 1973; Butler et al., 1975; Karlsson et al., 1980). Dies sei unter anderem dadurch bedingt, daß in Tumoren normalerweise kein Lymphgefäßsystem angelegt sei (Gullino, 1975; Peters et al., 1980). Dies wiederum sei die Ursache für den höheren interstitiellen Druck im Tumorgewebe (Gullino, 1975; Wiig et al., 1981, 1982). Aus Messungen der O_2 - und der Glukoseextraktion wurde rückgeschlossen, daß eine Verminderung des Sauerstoffverbrauches und des Glukoseverbrauches mit steigendem Tumorgewicht erfolgt (Gullino, 1975; Vaupel, 1976, 1982). In nahezu allen bisher durchgeführten

Studien zur Tumordurchblutung wurde über eine verminderte Perfusion im Vergleich zum Normalgewebe berichtet. Diese übereinstimmenden Ergebnisse sind jedoch nach Meinung mehrerer Autoren vor allem aus methodischen Gründen mit Vorsicht zu bewerten (Peterson et al., 1969, 1973; Peterson, 1979b, Appelgren, 1979, Ekelund, 1979).

Den bisherigen Untersuchungen zur Tumorphysiologie war häufig der Nachteil gemeinsam, daß es sich meist um Transplantattumore handelte, die z.T. in ortsfremdes Normalgewebe implantiert wurden, z.B. Lebertumorgewebe in Haut (Warren, 1979a, 1979b; Shubik, 1982;) und die Experimente nahezu ausnahmslos in Narkose durchgeführt werden mußten. Darüberhinaus spiegelten diese Untersuchungen in der Regel nur das stationäre Bild eines Tumors zu einem bestimmten Zeitpunkt des Tumorwachstums wieder. Quantitative Messungen einzelner Parameter während des Wachstums von Tumoren waren in den einzelnen Modellen meist nicht möglich. Hinzu kam, daß die Untersuchungen meist nur gemittelte Werte über das gesamte Tumoreal zeigten, ohne regionale Unterschiede innerhalb des Tumors zu berücksichtigen (Rubin und Casarett, 1966; Rogers et al., 1967, 1969).

Ausgangs der sechziger und im Verlauf der siebziger Jahre wurden mehrere neue quantitative Methoden vorgestellt, die es ermöglichten im Bereich der Mikrozirkulation quantitative Messungen an Einzelgefäßen in vivo durchzuführen (Intaglietta und Tompkins, 1972a, 1972b, 1973; Intaglietta et al., 1974; Tompkins et al., 1974; Gaethgens, 1977). Es war naheliegend, diese Methoden im Bereich der Tumormikrozirkulation anzuwenden, um damit neben Anordnung und Aufbau des Mikrogefäßsystems, insbesondere das funktionelle Verhalten der Mikrozirkulation in Tumoren im Verlauf des Wachstums zu erfassen.

3. Zielsetzung und Fragestellung

Ausgehend von den in den dreißiger und vierziger Jahren beschriebenen Kammermodellen und von der von PAPPENFUSS et al. vorgelegten Modifikation (Clark et al., 1930; Algire, 1943; Pappenfuss et al., 1979) war es zunächst Ziel ein Hautkammermodell zu etablieren, das eine bestmögliche Intaktheit

der Mikrozirkulation über einen Zeitraum von mehreren Wochen garantierte. In einer derartigen chronischen Mikrozirkulationspräparation sollte die Möglichkeit gegeben sein, Tumorzellen zu implantieren, um die Entstehung des Mikrogefäßsystems eines Tumors und der Tumormikrozirkulation quantitativ mit Hilfe von Videomikroskopie und Photomakroskopie zu erfassen. Im einzelnen sollten dann durch eine Analyse von Gefäßdurchmesser, Blutzellgeschwindigkeit, Kapillarlänge, Kapillardichte, Mikrohämatokrit, Gewebeerflächen- pO_2 etc. an diesem chronischen Kammermodell und der Tumormikrozirkulation folgende Fragestellungen und Zielsetzungen bearbeitet werden:

1. Welche quantitativen Veränderungen zeigt das Normalgefäßsystem dieser chronischen Mikrozirkulationspräparation ?
2. Wodurch ist die Tumormikrozirkulation und die Mikrozirkulation im tumorumliegenden Normalgewebe im Frühstadium des Tumorzustands charakterisiert?
3. Anwendung des Tumormodells für klinisch ausgerichtete Fragestellungen.

II. METHODIK

Die im folgenden dargestellten tierexperimentellen Untersuchungen wurden in der Zeit vom September 1979 bis Januar 1981 sowie Juli 1982 bis Dezember 1986 im Institut für Chirurgische Forschung der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt.

1. Versuchstiere und Versuchstierhaltung

63 etwa 6-8 Wochen alte männliche syrische Goldhamster (*Mesocricetus aureatus*) mit einem Körpergewicht von 72-98 g (mittleres Körpergewicht 80,3 g) sind in die Versuchsreihe einbezogen. Die Tiere stammten aus dem Goldhamsterinzuchtstamm des Instituts für Chirurgische Forschung.

Im Tierstall des Instituts für Chirurgische Forschung, in dem eine Umgebungstemperatur von 24°C und eine Luftfeuchtigkeit von 50 % herrschten, wurden jeweils drei Goldhamster in einem Käfig bei freiem Zugang zu Futter und Wasser gehalten. Die Tiere waren einem 12-stündig wechselnden Licht-Dunkelrhythmus ausgesetzt.

Drei Tage vor der Operation wurden die Tiere täglich durch Futterreize animiert, in transparente Plastikröhren zu kriechen, um dort für 1 Stunde zu verweilen. Damit wurden die Hamster an die - wie im Versuchsablauf (siehe 8.) dargestellt - postoperativ durchgeführten täglichen Meß- und Beobachtungsphasen gewöhnt. Goldhamster, die dies konstant verweigerten, wurden nicht in die Versuche einbezogen.

Nach ihrer Operation wurden die Versuchstiere jeweils in Einzelkäfigen und in einem Intensivpflege-Inkubator (Modell 7510; Dräger-Werk AG, Lübeck) untergebracht. Dort wurde an den ersten beiden postoperativen Tagen eine Umgebungstemperatur von 28°C eingestellt. Am zweiten Tag nach der Präparation (Tag 0 des Versuchsablaufs bzw. Tag der Tumorzellimplantation in der Tumorgruppe) wurde die Temperatur für die folgenden vier Tage auf 35°C

erhöht, um bei den Tieren, denen Tumorzellen inokuliert worden waren, eine möglichst hohe Tumorangehrate zu erzielen (siehe 8.). Dieses Vorgehen wurde aufgrund positiver Erfahrungen in den Vorversuchen gewählt. Die weiteren Umgebungsbedingungen blieben unverändert. Für die jeweiligen Beobachtungs- und Meßphasen mußten die Tiere aus dem Intensivpflege-Inkubator herausgenommen werden und in den o.e. transparenten Plastikröhren verweilen.

2. Entwicklung des transparenten Rückenhautkammermodells am Syrischen Goldhamster

2.1. Chronische transparente Kammermodelle für Mikrozirkulationsstudien - Literaturübersicht

Für intravitalmikroskopische Langzeituntersuchungen in der Mikrozirkulation, insbesondere für Studien der Tumorangiogenese und der Angioarchitektur von Tumoren, fanden seit den zwanziger Jahren zunehmend sogenannte transparente Kammermodelle Anwendung. Es wurden die unterschiedlichsten Modifikationen derartiger Kammern in Kaninchenohren (Sandison, 1924, 1928a, 1928b; Clark et al., 1930; Williams, 1934a, 1934b; Clark und Clark, 1935, 1939, 1954; Wood et al., 1958; Branemark and Lindström, 1963; Williams, 1967; Arfors et al., 1970; Leaf and Zarem, 1970), in Hamsterbackentaschen (Sanders, 1963; Sanders and Shubik, 1964; Goodall et al., 1965; Sewell, 1966; Greenblatt et al., 1969), sowie in die Rückenhaul von Mäusen (Algire, 1943; Algire und Legallais, 1947, 1949, 1951; Algire and Merwin, 1955) und Ratten (Trevan and Young, 1967; Yamaura et al., 1971; Yamaura et al., 1976; Papenfuss et al., 1979; Smith et al., 1985) implantiert. BRANEMARK hatte darüberhinausein Kammermodell an die menschliche Haut am Unterarm adaptiert (Branemark, 1971).

Mit Ausnahme der beiden genannten Kammermodelle für Mäuse und Ratten, zeigten alle genannten Tiermodelle eine ausgeprägte traumainduzierte Neovaskularisation. Gerade dies sollte in einer Präparation ausgeschlossen werden, in der durch Implantation von Tumorzellen oder soliden Tumorstückchen eine Neoangiogenese erzeugt und das sich neu entwickelnde Tumorgefäßsystem im

Verlauf seines Wachstums untersucht werden sollte. Dies war deshalb von Bedeutung, da das Anfangsstadium einer tumor- von einer traumabedingten Gefäßneubildung durch in-vivo Mikroskopie nur schwer zu differenzieren ist (Eriksson und Zarem, 1977). Die von ALGIRE und MERWIN beschriebene Technik schied deshalb für uns aus, da kein adäquater Tumor für Mäuse zur Verfügung stand und diesen Tieren nur mit großen Schwierigkeiten intravasale arterielle und venöse Dauerkatheter implantiert werden konnten (Algire and Merwin, 1955). Erste Vorversuche wurden mit einem an die Rückenhaut von Sprague-Dawley Ratten adaptierten Kammermodell durchgeführt (Papenfuss et al., 1979).

2.2. Vorversuche

Initial wurde versucht, das Kammermodell von Papenfuss et al. zu etablieren (Papenfuss et al., 1979). Wegen der im folgenden dargestellten Nachteile wurde auf dieses Vorgehen verzichtet:

- Die Tiere zeigten nach der Operation ein ausgeprägt aggressives Verhalten und versuchten, die Rückenhautkammer abzubeißen.
- Wegen der dadurch verursachten Aktivität der Tiere und wegen einer reduzierten Nahrungsaufnahme verloren die Ratten trotz intensiver und liebevoller Pflege innerhalb von 3 - 4 Tagen ca. 15 - 20 % ihres Körpergewichts.
- Die Tiere mußten wegen ihres aggressiven Verhaltens für die Beobachtungsphasen einer leichten Pentobarbitalnarkose unterzogen werden (20 - 40 mg/kg intraperitoneal)
- Um eine optimale Transparenz der Kammerpräparation zu erzielen, mußte die Haut von beiden Seiten abpräpariert werden.
- Im Gegensatz zu den in der Literatur angegebenen Befunden, war die traumainduzierte Neovaskularisation stark ausgeprägt.
- Die Kammern entzündeten sich häufig und zeigten oftmals Abflußbehinderungen im venösen Gefäßschenkel der Mikrozirkulation.

Als Beispiel für die korkenzieherartige Schlingelung und Dilatation von venösen Gefäßen und einer starken traumainduzierten Neovaskularisation mag

die von PETERS et al. publizierte Abbildung einer sog. "Normalpräparation" gelten (Peters et al., J. Natl. Canc. Inst., Vol. 65, S. 639, 1981).

2.3. Anforderungen an ein neues Kammermodell

Aufbauend auf dem in der Literatur beschriebenen Kammermodell für Maus (Algire et al., 1943) und den daran orientierten Modellen für die Rückenhaut von Ratten (Yamaura et al., 1976; Papenfuss et al., 1979) wurden an ein neu zu entwickelndes chronisches Kammermodell, adaptiert an die Rückenhaut von Hamstern, folgende Forderungen gestellt:

- Stabilität der Kammer,
- gute Verträglichkeit ohne wesentliche Beeinträchtigung der Tiere in ihrem Verhalten (Nahrungsaufnahme, Gewicht),
- ausreichende Transparenz und bestmögliche optische Qualität, da sowohl Durchlicht- als auch Auflichtmikroskopie durchgeführt werden sollten,
- eine wiederholte Beobachtung identischer Gewebeareale über einen Zeitraum von mehreren Wochen sollte möglich sein,
- die Untersuchungen sollten bevorzugt am nicht-anästhesierten Tier ermöglicht werden, um die anaesthetie-bedingten Effekte auf die Mikrozirkulation auszuschließen (Übersicht bei Longnecker und Harris, 1980a, 1980b; Longnecker, 1984)
- auf die Forderung einer möglichst geringen traumainduzierten Neovaskularisation wurde bereits hingewiesen; diesbezüglich sollten Plexiglasscheiben als Sichtfenster verwendet werden, da diese keine Neoangiogenese induzieren (O'Donoghue und Zarem, 1971; Eriksson und Zarem, 1977)
- die Möglichkeit eines direkten Zugangs zur Präparation sollte gegeben sein, um in dieser Präparation gezielte Manipulationen, z.B. Tumorzell-implantation, bzw. direkte Messungen (Oberflächengewebe- pO_2 , Mikrodruckmessungen), durchführen zu können,
- nach einer akuten Präparation sollten die wesentlichen Kriterien einer intakten Mikrozirkulationspräparation erfüllt sein (siehe 5.), d.h. die ideale Kammerpräparation "muß anatomisch und physiologisch normal sein" (Sewell, 1966),

Darüberhinaus sollte es möglich sein, intravasale Dauerkatheter zu implantieren. Diese waren zur Entnahme von Blutproben für Blutgasbestimmungen bzw. als Applikationsweg für Pharmaka oder Fluoreszenzmarker vorgesehen.

2.4. Modell der transparenten Rückenhautkammer für Hamster

Die beiden entsprechend der Konstruktionsvorlagen neu gefertigten gleich großen Kammerhälften (Fa. Effenberger, München) bestanden aus speziell gehärtetem Aluminium, sogenanntem Dural, und wurden bei einer Temperatur von etwa 400° C mit Teflon S (Fa. Huth, Starnberg) beschichtet. Durch diesen ca. 100 µm dicken Überzug der beiden Kammerhälften wurde eine gute Hautverträglichkeit erzielt, sowie die Temperaturleitfähigkeit vermindert und scharfe Kanten derart abgestumpft, daß dadurch keine Rißwunden verursacht werden konnten. In Abbildung 1 ist die Konstruktionsskizze der verwendeten Hautkammer wiedergegeben.

3. Präparation der Versuchstiere

3.1. Vorbereitung der transparenten Rückenhautkammer

Neben den für die Präparation verwendeten Instrumenten wurden auch die Hautkammern und die dazugehörigen Schrauben, Distanzmuttern, Sprengringe (Fa. Keller & Kalmbach, München) und Deckgläschen (Fa. Menzel, Braunschweig) dampfsterilisiert. Vor Präparationsbeginn wurden in einer Kammerhälfte die drei Schrauben mit den zugehörigen Distanzmuttern befestigt. In der kontralateralen Hälfte wurde das 0,1 mm dicke, kreisrunde Deckglas (Durchmesser: 11,5 mm) mit Hilfe eines Sprengringes fest fixiert. Die Distanz zwischen den beiden Kammerhälften wurde durch Kfz-Ventileinstellblätter überprüft und, wenn nötig, durch Hinzufügen von Beilagscheiben auf 450 µm eingestellt, um eine Kompression der Rückenhautfalte zu vermeiden. Das Gesamtgewicht einer derartig vorbereiteten Kammer betrug ca. 3,5 g.

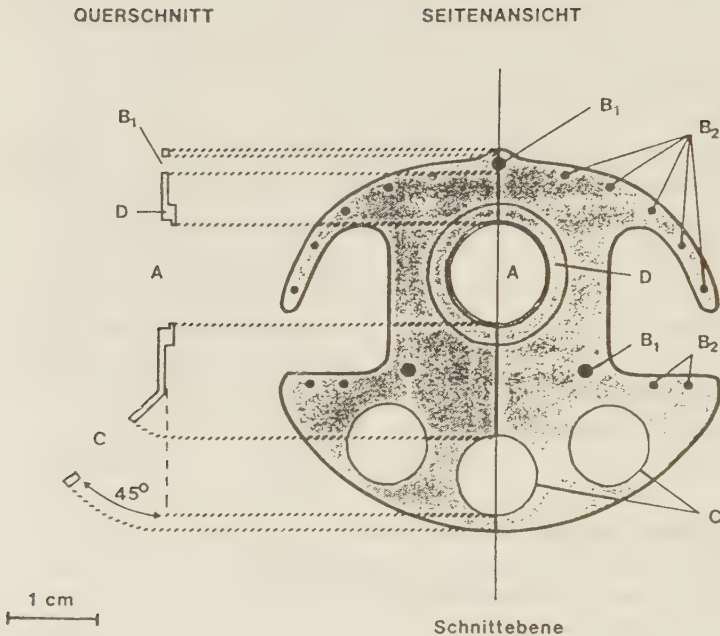


Abbildung 1:

Konstruktionsskizze einer Rückenhautkammerhälfte. In der Seitenansicht ist die Schnittebene des Querschnittes, der am linken Bildrand dargestellt ist, wiedergegeben. Die Rückenhautkammer setzt sich aus zwei spiegelbildlich durch Schrauben verbundenen Kammerhälften zusammen.

A = Öffnung für das Präparationsareal; B₁ = Bohrungen für die Schrauben, die zur Fixierung der Distanzmutter und zur Adaptierung der beiden Kammerhälften dienen; B₂ = Bohrungen für die Haltefäden; C = Öffnungen im Bereich des Sattels zur Reduktion des Kammergewichtes; D = Kammerring, in dem das transparente Plexiglas und der Sprengring fixiert werden.

3.2. Implantation der Rückenhautkammer

Die Präparation wurde unter aseptischen Kautelen durchgeführt. Die Tiere wurden durch intraperitoneale Injektionen von Pentobarbital (Nembutal^R; Abbott GmbH, Ingelheim), das in einer Dosierung von 60-80 mg/kg Körpergewicht verabreicht wurde, narkotisiert. Nach Bedarf wurde die Narkose durch zusätzliche Gaben von Pentobarbital (10 mg/kg Körpergewicht) aufrechterhalten. Die Haare der Rückenhaut und der ventralen Halsregion wurden durch Elektrorasur (Electra GH 204; Aesculap, Tuttlingen) und nachfolgender chemischer Depilation (Pilca med.; Olivia, Hamburg) entfernt und die Haut zunächst mit befeuchteten Gaze-Tupfern gereinigt. Um Reste der Enthaarungscreme zu entfernen und um aseptischen Bedingungen zu genügen, wurde die Haut dreimal mit Waschäther und einmal mit 70 %-igem Alkohol desinfiziert.

Nach Fixierung der Tiere in Bauchlage auf einem auf 37⁰ C aufgeheizten Kleintier-Operationstisch (Fa. IFB, Hiddenhausen) wurde entlang der Wirbelsäule die Mittellinie auf der nackten Rückenhaut mit einem Filzschreiber markiert. Vor Präparationsbeginn wurde durch kurzes Anheben der leicht mobilisierbaren Hamsterrückenhaut die anatomische Lage der Hauptversorgungsgefäße und des Musculus retractor im Gegenlicht der Op.-Leuchte kontrolliert. Die Lage des transparenten Sichtfensters war kranial des Insertionsgebietes des Retractor Muskels und kaudal der entlang der Schulterbasis verlaufenden Versorgungsgefäße vorgesehen. Hierbei sollten die beiden an der Basis der Kammer gelegenen Schrauben innerhalb der versorgenden Hauptgefäßstämme durch die Hautfalte präpariert werden (siehe 4.).

Entsprechend dieser jeweils eingangs der Präparation durchgeführten Orientierung wurde zunächst die Rückenhaut entlang der Mittellinie abgehoben und an der dem Präparator abgewandten Seite der Kammerhälfte mit zwei Haltenähten in den zu beiden Seiten der apikalen Schraube nächstgelegenen Bohrungen fixiert. Die in dieser Kammerhälfte befestigten Schrauben wurden durch die Haut präpariert, ohne dabei zu große Zugkraft auf die Rückenhaut auszuüben. Durch Fixation dieser Schrauben mittels zweier gebogener chirurgischer Klemmchen wurde diese Kammerhälfte vorübergehend an die Haut adap-

tiert.

Die weitere Präparation erfolgte in Seitenlage, so daß das Präparationsgebiet horizontal zum Liegen kam. Durch eine Schablone wurde ein kreisrundes Areal markiert. Innerhalb der Markierungen wurde zunächst mit einem Skalpell (Größe 11; Feather Industry Ltd., Japan) ein Kreuzschnitt durchgeführt und ein kreisrundes Hautareal von 1-1,3 cm Durchmesser aus der zugewandten Rückenhauthälfte exzidiert, ohne dabei die weiteren, unter der Subcutis gelegenen, Gewebeschichten zu verletzen (Abbildung 2). Unter kontinuierlicher Befeuchtung des Präparationsareals mit ca. 35^o C warmer Natriumchlorid- oder Ringerlösung wurden der unter dem subkutanen Fettgewebe gelegene Hautmuskel und der doppellagige Retraktormuskel mittels einer Uhrmacherpinzette und einer gebogenen ophthalmologischen Präparierschere reseziert. Um Mikrotraumen des darunterliegenden Hautmuskels der kontralateralen Seite und des Subcutangewebes zu vermeiden, wurde vorsichtig und mit großer Sorgfalt präpariert. Mikroblutungen aus den verbleibenden Gewebeschichten am Rande des Präparationsgebietes wurden durch 10-30 sec langes Abklemmen der Gefäße mit einer Pinzette oder einem Nadelhalter gestillt. In Ausnahmefällen wurde das blutende Gefäß ligiert (Prolene 6-0; Fa. Ethicon, Norderstedt). Mikroblutungen im Zentrum des Präparationsareals wurden durch Kompression mit befeuchteten Watteträgern zum Stehen gebracht. Diese befeuchteten Wattestäbchen wurden auch zur Identifikation des meist leicht mobilisierbaren Panniculus adiposus verwendet. Das Unterhautfettgewebe war insbesondere bei den Tieren mit mehr als 85 g Körpergewicht nachzuweisen. Waren derartige Fettgewebsareale nicht mehr lokalisierbar, d.h., konnten sie nicht durch die Adhäsionskräfte des befeuchteten Wattestäbchens abgehoben werden, wurde die diesseitige Kammerhälfte mit dem eingelassenen Sichtfenster an die drei Distanzschrauben der kontralateralen Kammerhälfte mit drei Schraubenmuttern fixiert. Wenn auf das befeuchtete Präparationsareal keine übermäßig starken Zugkräfte wirkten, schmiegte es sich aufgrund der Adhäsionskräfte an das Sichtfenster an. Die Hautfalte wurde durch weitere vier Haltefäden (Ethibond, 5-0; Fa. Ethicon, Norderstedt) in den vorgesehenen Bohrungen am Kammerrand und neben den beiden basal gelegenen Schrauben fixiert. Verbliebene Luftbläschen im Sichtfensterbereich wurden mittels

QUERSCHNITT DURCH KAMMERRING UND HAUTKAMMERGEWEBE

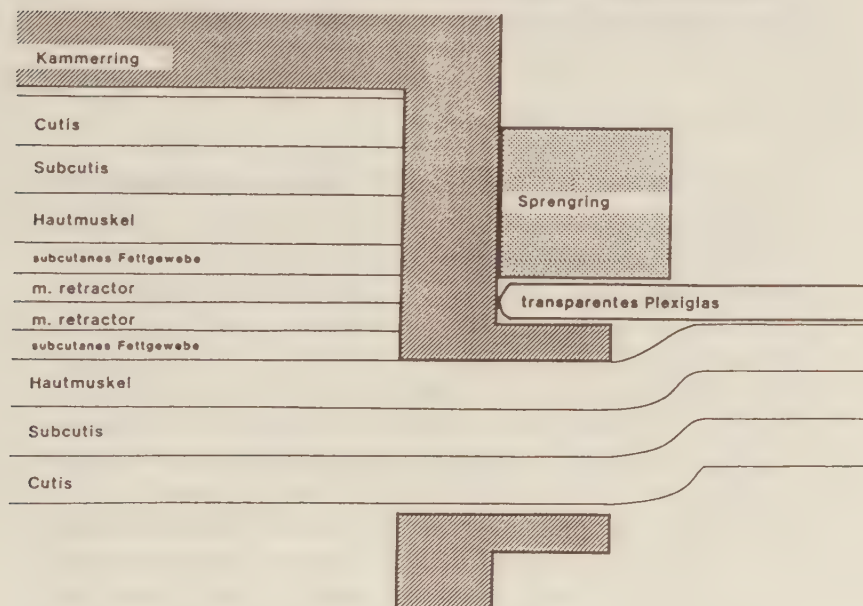


Abbildung 2:

Graphische Darstellung der Hautschichten im Bereich des Kammerringes und Darstellung der Fixierung des transparenten Plexiglases mit Hilfe eines Sprengringes innerhalb des Kammerringes.

einer dünnen Kanüle (Größe 20, 0,42 x 22 mm; B. Braun Melsungen AG, Melsungen) und einer 1 ml Tuberkulinspritze (B. Braun Melsungen AG, Melsungen) vom Kammerrand her aspiriert. Abbildung 3 zeigt einen narkotisierten Syrischen Goldhamster unmittelbar nach Kammerimplantation.

3.3. Implantation der Dauerkatheter

Die zur Implantation vorgesehenen Katheterenden der beiden Polyäthylenkatheter (PE-10, Innendurchmesser: 0,28 mm, Außendurchmesser: 0,61 mm; Clay Adams Co., Parsippany, New Jersey bzw. Portex: 800/110/100/100; Außendurchmesser: 0,56 mm; Portex Ltd., Lythe, Kent, England) wurden vor Implantation gering extendiert. Dies erhöhte die Flexibilität der Katheter. Dadurch wurde das Perforationsrisiko vermindert und durch die Verminderung des Außendurchmessers die Insertion in das Gefäßlumen erleichtert. Die Katheterenden wurden auf einer Länge von 7 cm in 0,5 cm Abständen mit einem steril verpackten Filzschreiber markiert. Bei der Implantation der Katheter wurde wie folgt vorgegangen: In Kehlkopfhöhe wurde ein Abbocath (Abbocath-T 14 G x 51 mm; Abbott Ireland LTD., Sligo, Republic of Ireland) transcutan eingeführt und subcutan entlang der rechten Halsseite bis zum kranialen Ende der Kammer vorgeschoben und dort durch die Haut wieder nach außen geführt. Die 20 cm langen kochsalzgefüllten Polyäthylenkatheter wurden in Gegenrichtung nach vorhergehender Desinfektion durch diesen Abbocath vorgeschoben. Der Abbocath wurde wieder entfernt und die weitere Präparation in Rückenlage vorgenommen.

Das weitere operative Vorgehen war an der von POPOVIC und POPOVIC beschriebenen Technik orientiert (Popovic und Popovic, 1960). Nach einer Längsinzision über der Trachea wurden die rechte Arteria carotis communis und die rechte Vena jugularis mittels geeigneter Mikroinstrumente und unter Zuhilfenahme eines OP-Mikroskops (Carl Zeiss GmbH, Wetzlar) freipräpariert. Die beiden Polyäthylenkatheter wurden in die Gefäße eingeführt und bis zum Aortenbogen bzw. zur Vena jugularis vorgeschoben und mit Seide der Stärke 5-0 (Ethibond 5-0; Ethicon GmbH, Norderstedt b. Hamburg) am Insertionsort fi-

xiert. Über Statham-Druckelemente wurden arterieller Blutdruck mit Herzfrequenz und zentralvenöser Druck registriert (siehe 9.5.). Nach erneuter Testung auf Aspirationsmöglichkeit wurden beide Katheter durch Verknoten der Katheterenden verschlossen. Die ca. 10 cm aus der Rückenhaut ragenden Katheter wurden am oberen Kammerrand durch vier Haltenähte an den hierfür vorgesehenen Bohrungen fixiert (siehe: B₂ in Abbildung 1).

4. Gefäßversorgung und Angioarchitektur der Hamsterhautkammerpräparation

Die beiden in 3.2. genannten Hauptgefäßstämme zwischen denen das Fensterareal jeweils plaziert wurde, sind Rami cutanei der dorsalen Intercostalarterien und treten in Verlängerung der Scapularlinie in die subcutan gelegenen Hautschichten ein. Der craniale Ramus entspringt auf Ebene der Schulterbasis, der zweite ca. 3 cm caudalwärts. Diese beiden Gefäße anastomosieren und geben aus der gemeinsam gebildeten Arkadenarteriole sogenannte Transversalarteriolen ab, über die einerseits eine Verbindung zu Gefäßen der Schwanzregion und der Kopfhaut hergestellt wird und die andererseits mit 2 - 4 Ästen das Präparationsareal versorgen und im Bereich des basalen Fensterrandes mit Rami cutanei der A. brachialis anastomosieren (Abbildung 4).

Aus diesen Transversalarterien entspringen im Bereich der Sichtfenster 13 - 25 terminale Arteriolen, wobei 4 - 12 dieser Gefäße nur den Hautmuskel versorgen und die restlichen abzweigenden terminalen Arteriolen jeweils im Subcutangewebe münden und die Versorgung der Haut übernehmen. Diese in das Subcutangewebe verlaufenden Äste waren mit der verwendeten Fluoreszenzmikroskopie nicht weiter zu verfolgen.

Die terminalen Arteriolen geben 2 - 10 präkapilläre Gefäße ab, die jeweils wiederum 4 - 15 Kapillaren versorgen. Diese gehen in Postkapillaren über, die z.T. ebenso wie die Kapillaren untereinander anastomosieren können (Abbildung 5). Die Postkapillaren münden in das reich verzweigte und anastomosierende Netzwerk von Sammelvenolen. Die daraus sich anschließenden Venolen verlaufen z.T. parallel zu den Transversalarteriolen, begleiten jedoch im-

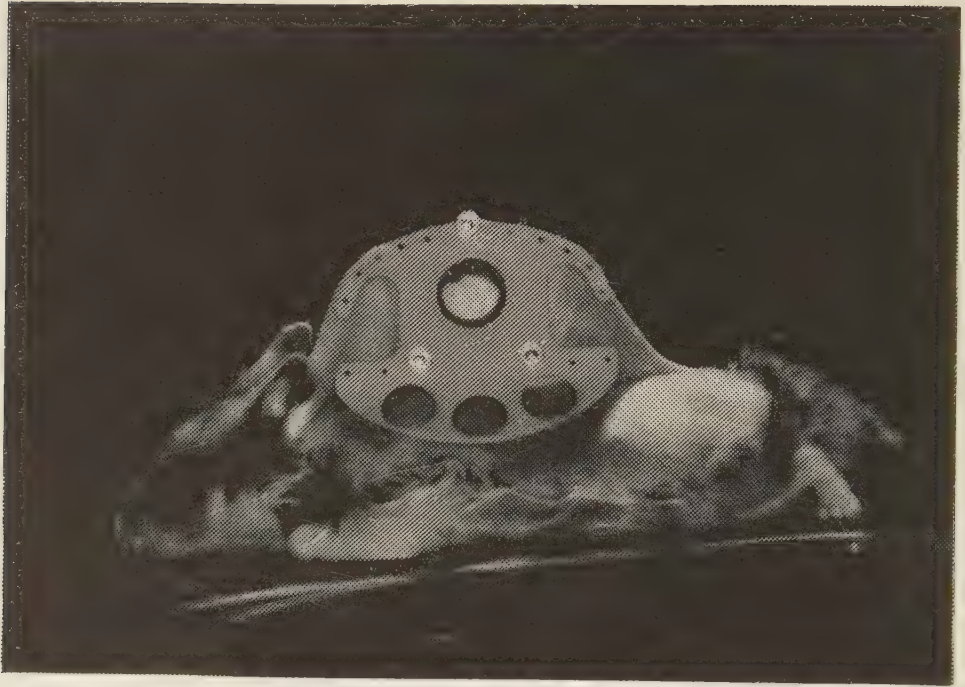


Abbildung 3:

Beispiel einer Rückenhautkammer mit zentralem Präparationsareal unmittelbar nach Implantation in die Rückenhautfalte eines männlichen Syrischen Goldhamsters.

ARTERIELLE GEFÄßVERSORGUNG DES RÜCKENHAUTKAMMERAREALS

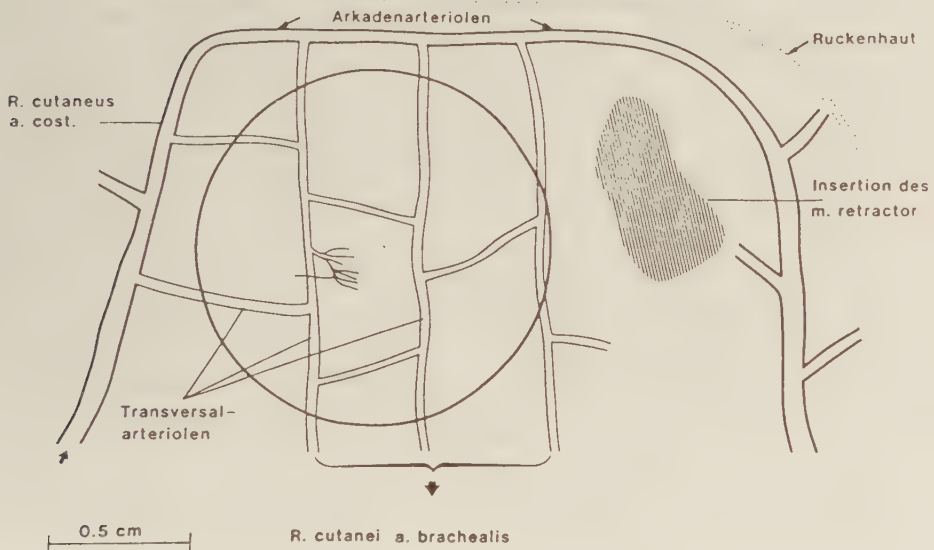


Abbildung 4:

Graphische Darstellung der arteriellen Gefäßversorgung des Rückenhautkammerareals. Aus den Rami cutanei der Intercostalarterien entspringen Arkadenarteriolen, die über Transversalarteriolen mit den Rami cutanei der Arteria brachialis anastomosieren. Der eingezeichnete Kreis kennzeichnet schematisch die Lage des zentralen Präparationsareals, das cranial der Insertion des Musculus retractor lokalisiert werden muß.

GEFÄßVERSORGUNG DES HAUTMUSKELS IM PRÄPARATIONSAREAL

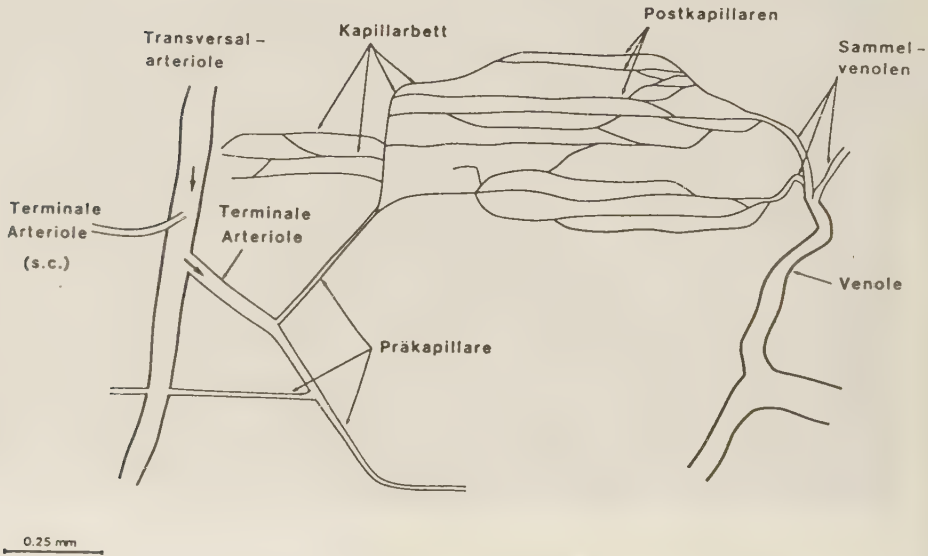


Abbildung 5:

Graphische Darstellung der Gefäßversorgung eines Hautmuskels im Präparationsgebiet. Wiedergegeben ist die in den Untersuchungen verwendete Nomenklatur der aufeinanderfolgenden Gefäßsegmente der Mikrozirkulation: Transversalarteriolen, terminale Arteriolen, Präkapillaren, Kapillaren, Postkapillaren, Sammelvenolen und Venolen. Auffallend ist die parallele Anordnung der Skelettmuskelkapillaren.

mer die Arkadenarteriolen. Das Durchmesser Verhältnis der parallel verlaufenden Venolen und Arteriolen betrug 3:1 in intakten Präparationen und steht damit in Übereinstimmung mit vergleichbaren Muskelpräparationen (Gaethgens, 1977).

5. Definition der Auswahlkriterien einer intakten Mikrozirkulationspräparation

Es wurden Präparationen in den weiteren Versuchsablauf nur dann einbezogen, wenn sie am ersten und zweiten postoperativen Tag den mikroskopischen und makroskopischen Beurteilungskriterien genügten. Weiterhin wurden nur Tiere mit Normalverhalten akzeptiert, d.h. normale Nahrungsaufnahme, kein Gewichtsverlust, Reaktion auf akustische Reize und auf Futterreize etc. Die Möglichkeit der Aspiration von Blut bzw. die intravasale Druckmessung über die beiden implantierten Katheter mußte gegeben sein. Ausschlusskriterien waren eine makroskopisch erkennbare Entzündung oder Infektion im Präparationsareal oder im Bereich der Halsinzision.

Das makroskopische Bild der Präparation (Abbildung 6) und deren Beurteilung im Intravitalmikroskop mußten am zweiten postoperativen Tag, dem Tag der Tumorzellimplantation, den im Folgenden dargestellten Anforderungen genügen. Für die mikroskopische Beurteilung der Mikrozirkulation waren hierbei die in der Mikrozirkulationsforschung generell akzeptierten Prinzipien maßgebend (Sewell, 1966; Zweifach, 1973):

- kein Vorhandensein von Pus, Blutungen oder petechialen Hämorrhagien im Kammerareal
- keine oder nur geringe Traumatisierung, d.h. keine oder nur geringe traumainduzierte Neovaskularisation (Eriksson und Zarem, 1977)
- keine Abflußstauung, d.h. keine Stase in postkapillären oder venösen Gefäßabschnitten (venuläre Blutzellgeschwindigkeit $> 0,3 \text{ mm/s}$)
- keine mäanderförmige Schlingelung und Dilatation von Postkapillaren und

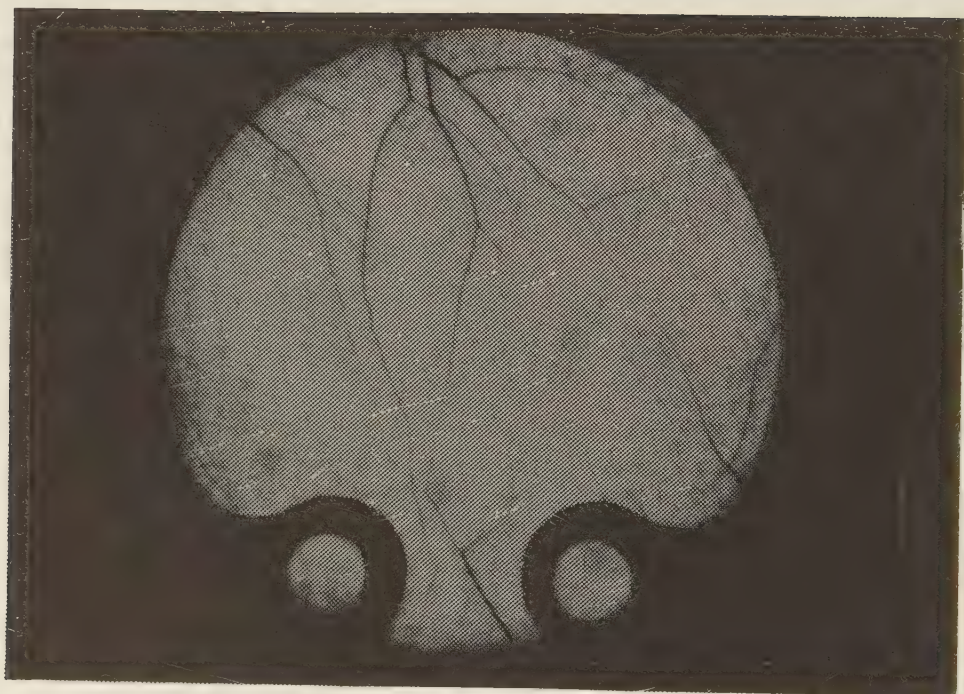


Abbildung 6:

Makroskopische Abbildung einer Kammerpräparation, die den Anforderungen einer intakten Mikrozirkulationspräparation genügte. Die Präparation zeigt keine Anzeichen einer Entzündung, Infektion oder Abflußstauung.

Venolen

- Durchmesser Verhältnis von Arteriolen zu Venolen von etwa 1:3 oder 1:4 (Gaethgens, 1977, 1982)
- keine Anzeichen von Entzündung (Übersicht bei Zweifach, 1973):
 - (a) keine zunehmende Vasodilatation
 - (b) keine exzessive Steigerung des Blutflusses
 - (c) keine Ödembildung
 - (d) keine Permeabilitätsstörung, d.h. kein Austritt von Fluorescein-isothiocyanat(FITC)-Dextran 150 (Pharmacia AB, Uppsala, Schweden) aus dem Intravasalraum über einen Zeitraum von 3 Stunden sowie keine fokalen Austritte dieses FITC-Dextrans - "leaky spots" (Svensjö et al., 1978)
 - (e) kein Anhaften oder Entlangrollen von Leukozyten am Endothelwall von Postkapillaren und Venolen, sowie keine Migration von Leukozyten in das Interstitium (Clark, 1935; Grant, 1973; O-Flaharty und Ward, 1979)

Im Gegensatz zur Auffassung der Autoren, die ebenfalls mit der Hamsterrückenhautkammerpräparation arbeiteten, stellte im Rahmen dieser Untersuchungen das Vorhandensein einer spontanen arteriolen Vasomotion, d.h. spontaner rhythmischer Durchmesserschwankungen, kein unverzichtbares Kriterium für eine intakte Mikrozirkulationspräparation dar (Colantuoni et al., 1982, Funk et al., 1983a, 1983b; Messmer et al., 1984, Colantuoni et al., 1984a, 1984b) Eine darartige Vasomotion wurde in etwa 40 % der Präparationen beobachtet. Für die Durchmesserbestimmung bedeutete dies, daß bei rhythmischen Durchmesserschwankungen der Mittelwert zwischen dem maximalen und minimalen Wert errechnet wurde. (siehe 9.6.3.2.)

6. Tumorzelltransplantation

Das am Institut für Chirurgische Forschung vorhandene amelanotische Hamstermelanom (A-MEL-3) wurde freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. med. C. Hammer zur Verfügung gestellt. Die Zelllinie entstammt dem erstmals von Fortner beschriebenen Originaltumor (Fortner et al., 1961). Durch die Herstellung einer reinen Tumorzellpopulation sollten für die Versuchsserie konstante Bedingungen für die Tumorzelltransplantation und für das nachfolgende Tumorstadium geschaffen werden. Aus diesem Grunde wurde eine dreimalige Tierpassage des A-Mel-3-Tumors im Inzuchtstamm der Syrischen Goldhamster des Instituts für Chirurgische Forschung durchgeführt und anschließend die Tumorzellen in Kultur gebracht (Abbildung 7).

6.1. Tierpassage

Vorgehen: Der in Stickstoff eingefrorene Tumor wurde bei 37° C aufgetaut und zweimal in Hank'scher Lösung (Apotheke des Klinikums Großhadern) gewaschen und bei 1600 U/min zentrifugiert. Durch Zugabe Hank'scher Lösung wurden jeweils 10 ml Zellsuspension hergestellt. Die Vitalität, getestet mit Trypanblau (siehe 6.3.), lag bei etwa 80 - 90 %. Die Zellsuspension wurde auf fünf Portionen à 2 ml aufgeteilt und etwa 6 - 8 Wochen alten männlichen Hamstern paravertebral subcutan injiziert. Nach 14 Tagen bildeten sich Tumore mit einem Durchmesser von 1 - 2 cm. Für die Weiterverarbeitung wurden lediglich Tumore verwendet, die die Haut nicht penetriert hatten, d.h. nicht potentiell infiziert waren. Hierzu wurden die Tiere durch eine Überdosis an Äther getötet. Mittels chemischer Depilation wurden die Haare vom Rücken der Tiere entfernt. Die Kadaver wurden für 10 Minuten in Merfen getaucht, die Tumore steril entnommen und in Hank'sche Lösung gelegt. Unter dem 'laminar-flow' wurden die Tumore über ein Sieb bzw. ein Gitter geschabt, um Einzelzellsuspensionen zu gewinnen. Zurückbleibende Gewebestandteile wurden verworfen. Die Zellsuspension wurde mit Pasteurpipetten aufgesogen und in sterilen Röhrchen (Nunc) in Hank'scher Lösung gewaschen. Diese Zellsuspension wurde neuerlich fünf Tieren injiziert. Eine derartige

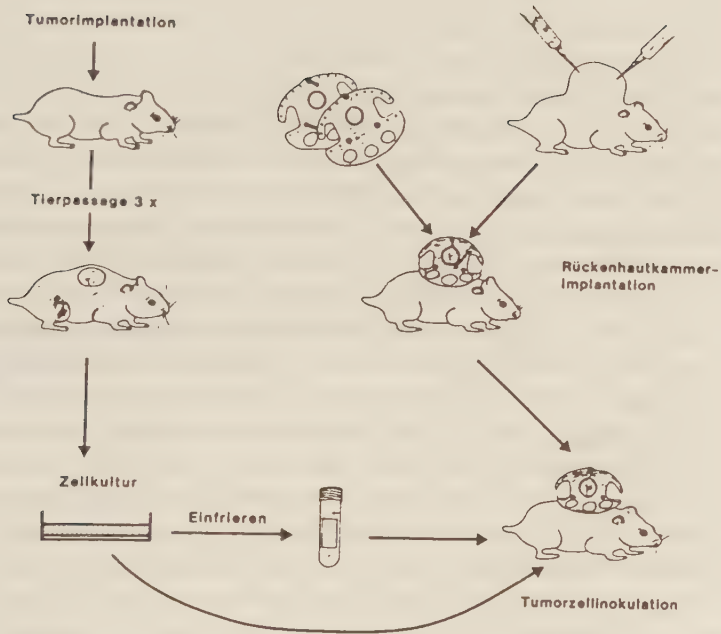


Abbildung 7:

Graphische Darstellung des experimentellen Vorgehens zur Herstellung einer reinen Tumorzellpopulation bis hin zur Tumorzellimplantation in das Präparationsareal einer in die Rückenhaut Syrischer Goldhamster implantierten Aluminiumkammer.

Tierpassage wurde zweimal wiederholt.

6.2. Kultur der Tumorzellen

Nach Ende der dritten Tierpassage wurde mit den Tumoren bzw. den Tumorzellen in der o.a. Weise verfahren. Anschließend wurden die Zellen - neben Tumorzellen waren auch andere Zellen, z.B. Fibroblasten vorhanden - dreimal in Waschmedium suspendiert und bei 2000 U/min zentrifugiert.

Das Waschmedium wurde durch Lösung von RPMI-Trockenpulver, d.h. 10,39 g/l Instamed mit L-Glutamin ohne NaHCO_3 (Seromed^R; Biochrom KG, Berlin), in 1 l Aqua dest. und nachfolgender Sterilfiltration (Filterdurchmesser: 6 mm; Seitz, Bad Kreuznach) hergestellt. Für Kultur und Einfriermedium wurden einem Liter Waschmedium 10 ml einer Kombination von Penicillin und Streptomycin (1 %ige Lösung), d.h. 10×10^4 E. Penicillin und 10×10^4 E. Streptomycin (jeweils Biochrom KG, Berlin) zugegeben. Für ein Kulturmedium mußte unter sterilen Bedingungen 10 % fetales Kälberserum (FKS; Boehringer, Mannheim) und für ein Einfriermedium 20 % FKS und 20 % Dimethylsulfoxid (DMSO; Serva, Heidelberg) zugesetzt werden. Nach Zentrifugation und Abgießen des überständigen Waschmediums und nachfolgender Lösung von etwa 10 Mio. Zellen in 2 ml Einfriermedium wurden die Zellen schrittweise auf 0°C , -20°C und schließlich auf -70°C abgekühlt und in der Flüssigphase von Stickstoff tiefgefroren. Der andere Anteil der zentrifugierten Zellen wurde in Kulturmedium suspendiert, um die Tumorzellen in vitro zu züchten. Hierzu wurden die Zellen im Kulturmedium in Petrischalen ausgesät und im Brutschrank (CO_2 -incubator model 3028; Firma Scientific Inc., Marietta, Ohio, USA) bei 37°C , 90% Luftfeuchtigkeit und 5 % CO_2 -angereicherter Luft gezüchtet. Nach jeweils 3 Tagen konnten die Tumorzellen "geerntet" werden, indem sie mit Trypsin-EDTA (Boehringer, Mannheim) aus den Petrischalen abgelöst wurden. Die Tumorzellen konnten dann entweder nach dem oben angegebenen Schema eingefroren oder entsprechend dem in 6.3. beschriebenen Vorgehen implantiert werden. Damit war kontinuierlich eine ausreichende Anzahl an Tumorzellen verfügbar.

6.3. Vorbereitung der Tumorzellen

Die eingefrorenen Tumorzellen wurden in einem Wasserbad bei 37° C aufgetaut, dreimal in Hank'scher Lösung gewaschen und bei 1600 U/min zentrifugiert, um das zytotoxisch wirkende DMSO aus der Suspension zu entfernen. Der Überstand an Hank'scher Lösung wurde nach dem dritten Waschgang abgossen und ein Teil der verbleibenden Tumorzellsuspension wurde mit einer 10 Mikroliterspritze (Fa. Hamilton, Bonaduz, Schweiz) aspiriert. Die ersten beiden Mikroliter des Aspirats wurden verworfen, der dritte und vierte Mikroliter in einem Zellcounter nach dem Coulterprinzip ausgezählt (Coulter Counter ZM, Coulter Electronics Ltd, Luton, Beds., England), der fünfte Mikroliter in das Präparationsareal inokuliert (siehe 6.4.), der sechste und siebte Mikroliter wiederum im Counter ausgezählt. Wie Vorversuche zeigen konnten, ließ sich aus dem arithmetischen Mittel der vier ausgezählten Volumina die Anzahl an inokulierten Tumorzellen mit einer Abweichung von etwa 10 % einstellen. Die Zellvitalität wurde durch Trypanblaufärbung der Tumorzellen, die in den ersten und letzten beiden Mikrolitern aus der Spritze entnommen worden waren, ermittelt. Hierzu wurden 400 Zellen unter einem Lichtmikroskop nach Trypanblaufärbung gezählt. Die Färbung der Tumorzellen wurde durchgeführt, indem die Zellen zu einer Lösung aus Trypanblau und 1,8 % NaCl-Lösung (Verhältnis 1:1) zugegeben wurden. Eine Blaufärbung der Zellen zeigte den Zelltod an.

Die Anzahl der inokulierten Zellen lag zwischen 30.000 und 50.000, die Vitalität um 90 %.

6.4. Tumorzellimplantation

Die präparierten Versuchstiere mit Rückenhautkammer wurden in Plastikröhren immobilisiert und auf einem Plastiktisch fixiert. Das Deckgläschen wurde nach vorhergehender Befeuchtung des Areals abgenommen. Aus der Mikroliterspritze wurde in das zentral gelegene Areal der Kammerpräparation ein Mikroliter (ca 30.000 - 50.000 Tumorzellen; siehe 6.3.) inokuliert. Dies

erfolgte 48 Stunden nach der Hautkammerpräparation.

Unmittelbar vor Tumorzellimplantation wurde eine makroskopische Beurteilung des Kammerareals und eine mikroskopische Überprüfung der Mikrozirkulation (siehe 5.), sowie eine Videoaufzeichnung des Areals, in das die Tumorzellen implantiert werden sollten, durchgeführt. Ebenso wurde das tumorumliegende Gewebe videomikroskopisch aufgezeichnet.

7. Fluoreszenzmarkierung von Erythrozyten

Zur Bestimmung des Mikrohämatokrits in den einzelnen Gefäßsegmenten der Mikrozirkulation (siehe 9.6.3.4.) mußte zunächst die Fluoreszenzmarkierung von Erythrozyten als Methodik etabliert werden. Der Markierungsvorgang war an dem von ZIMMERHACKL et al. beschriebenen Vorgehen orientiert (Zimmerhackl et al., 1983), wurde jedoch angesichts der eigenen Erfahrungen in Vorversuchen in einigen Abschnitten modifiziert, um den Fluoreszenzmarkierungsgrad zu erhöhen. In Abbildung 8 ist das Schema des etablierten Markierungsvorgangs wiedergegeben.

Einen Tag vor der geplanten Verwendung der fluoreszeinmarkierten Erythrozyten wurden 2 Goldhamster mit Pentobarbital narkotisiert und ein Katheter über die rechte Arteria carotis in die Aorta ascendens vorgeschoben (siehe 3.3.). Über diesen Katheter wurden die Tiere entblutet. Das Blut wurde in vorheparinisierte Spritzen (Heparin-Natrium; B. Braun-Melsungen AG, Melsungen) abgezogen.

Die Osmolarität und der pH-Wert der für die Markierung verwendeten Lösungen wurden vor Beginn des Markierungsvorganges kontrolliert und auf die im folgenden angegebenen Werte eingestellt. Der pH-Wert wurde mit einem pH-Meter (pH Digi 526, Wissenschaftlich Technische Werkstätten, Weilheim) und die Osmolarität mit einem Osmometer (Osmometer; Knauer KG Eppelheim) gemessen.

Um eine reine Erythrozytensuspension zu gewinnen, wurde das Blut viermal mit einem Alsever's Puffer (20,5 g Dextrose, 8,0 g Natriumcitrat, 0,55 g Zitronensäure in 1 l Aqua dest. gelöst) versetzt, jeweils 10 min bei 1600 U/min zentrifugiert, der jeweilige Überstand dekantiert und schließlich die

verbliebenen Erythrozyten mit einer Bicine-Saline-Lösung (3,264 g Bicine, 8,766 g NaCl, 10 ml NaOH in 1 l Aqua dest. gelöst, pH 8,3) im Verhältnis 1:1 verdünnt. Die Markierungsreaktion wurde in Gang gesetzt, indem Fluoresceinisothiocyanat (Isomer I No. F-7250, Sigma Chemical Co., St. Louis, Mi., USA) in einer Dosierung von 2 mg/1 ml Erythrozyten und ca. 1 Tropfen N-Dimethylformamid/1 ml Erythrozyten zugegeben wurden. Nach einer Stunde Lagerung im 25 °C warmen Wasserbad war der Markierungsvorgang beendet. Die markierten Zellen wurden erneut zentrifugiert, der Überstand dekantiert und die markierten Erythrozyten wiederum mit Bicine-Saline-Lösung versetzt. Dieser Waschvorgang wurde so lange wiederholt, bis kein FITC makroskopisch im Überstand mehr erkennbar war. Die Zellen mußten hierzu jeweils 3-5 mal gewaschen werden. Es wurde ein Zellausstrich gefertigt und unter dem Fluoreszenzmikroskop die Markierung der Erythrozyten mit FITC kontrolliert. Die Zellen konnten nur verwendet werden, wenn sie mit Hilfe der Restlichtkamera unter dem Fluoreszenzmikroskop (s. 8.3.) deutlich zu erkennen waren, d.h. im Videobild mußten die markierten Zellen hell aufleuchten. Derartig FITC-markierte Erythrozyten wurden mit einem Glukose-Barbital-Puffer (23,087 g Glukose, 0,759 g 0,230 g Barbitursäure, 0,356 g Magnesiumsulfat, 0,022 g Kalziumchlorid, 3,41 g Natriumchlorid in 1000 ml Aqua dest. gelöst, 300 mOsm, pH 7,4) versetzt, wobei ein Hämatokrit von 50 % eingestellt wurde. Diese markierten Zellen wurden im Kühlschrank bei 4 °C bis zum Akutversuch gelagert.

8. Versuchsablauf und Versuchsgruppen

8.1. Versuchsprotokoll zur quantitativen Analyse der Mikrozirkulation

Aufgrund von Messungen in Vorversuchen, wurde für die Versuchsreihe folgendes experimentelles Vorgehen gewählt. Täglich wurde das Gewicht der Tiere kontrolliert, die Photodokumentation mittels eines Photomakroskops und die Beurteilung der Präparation unter dem Intravitalmikroskop durchgeführt. Am zweiten postoperativen Tag wurden einem Teil der Tiere ($n = 34$) die Tumorzellen implantiert. Dieser Tag wurde im Versuchsablauf als Tag 0 bezeichnet. Von diesem Tag an wurden makrohämodynamische und mikrohämodynamische Messungen, sowie Messungen des Gewebeoberflächen- pO_2 und Blutgasanalysen durchgeführt. Dem dargestellten Schema entsprechend (Abbildung 9) wurden die hämodynamischen Messungen im 2-Tagerhythmus und die Messungen des regionalen Gewebeoberflächen- pO_2 im 4-Tagerhythmus wiederholt. Wie im Schema angegeben, wurden einige Tiere für elektronenmikroskopische bzw. histologische Untersuchungen an bestimmten Versuchstagen getötet ($n = 6$). Die Tiere, die zur Bestimmung des Mikrohämatokrites verwendet wurden, mußten ebenfalls nach dem Akutversuch entblutet und getötet werden ($n = 9$).

8.2. Ablauf der täglichen Einzeluntersuchungen

Nach der Entnahme aus dem Käfig wurde eine Gewichtskontrolle der Tiere vor den jeweiligen Versuchsphasen durchgeführt. Die Hamster wurden zunächst in einer transparenten Plastikröhre in der Weise immobilisiert, daß nur noch die Hautkammer mit den aufgenähten Kathetern aus dem längs verlaufenden Schlitz der Plastikröhre (Innendurchmesser: 6 cm) ragte. An diese Immobilisation waren die Tiere - wie eingangs dargestellt (siehe 1.2.) - zum Versuchszeitpunkt bereits adaptiert. Damit wurden unnötige Streßreaktionen vermieden. Über den an den Plastikröhren vorhandenen Anschluß wurden diese Röhren mit einer sauerstoffangereicherten Raumluft durchströmt. Die O_2 -Konzentration, gemessen mit einem Oxymeter (Oxycom; Drägerwerk AG, Lübeck), wurde auf 25 % eingestellt.

VERSUCHSPLAN : QUANTITATIVE MIKROZIRKULATIONSANALYSE IM A-MEL-3

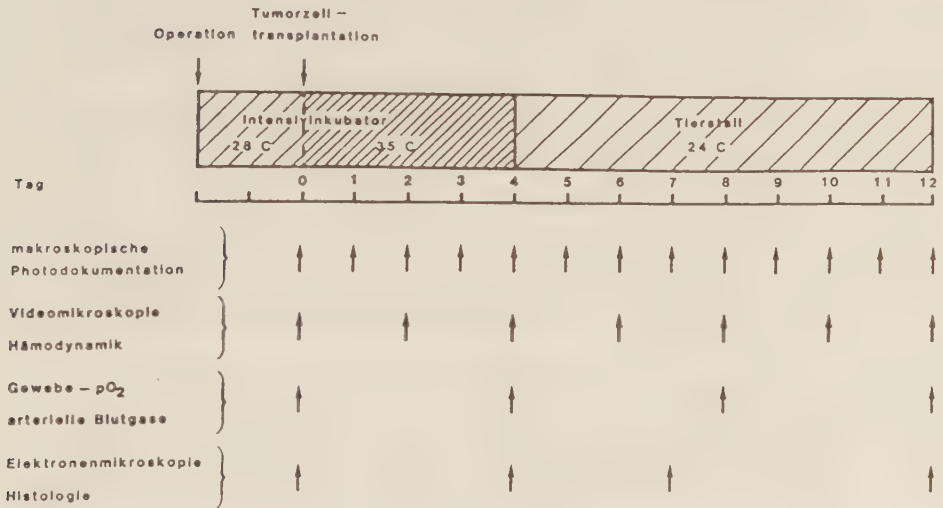


Abbildung 9:

Graphische Darstellung des Versuchsprotokolls zur quantitativen Mikrozi-
kulationsanalyse des amelanotischen Hamstermelanoms A-Mel-3 und der unbehan-
delten Normalpräparationen. Die mikrohäodynamischen Messungen wurden an-
hand der mikroskopischen Videoaufzeichnungen durchgeführt.

Die in diesen Röhren verweilenden Tiere wurden täglich für die Photodokumentation der Tumorstadiumskurve und zur vitalmikroskopischen Kontrolle, sowie für Videoaufnahmen und zur Messung des Oberflächengewebe- pO_2 auf einem eigens hierzu angefertigten Plexiglastisch horizontal fixiert (Abbildung 10). Die Katheternähte an der Hautkammer wurden entfernt, die Katheterlumina proximal der Knoten mit Einmalkanülen (Größe 20, 0,42 x 22 mm; B. Braun Melsungen AG, Melsungen) punktiert, die Aspirationsmöglichkeit geprüft und 50 μl Blut zur Blutgasanalyse entnommen.

Zur EKG-Ableitung wurden kleine Klebeelektroden auf der Rückenhaut am kranialen und kaudalen Kammerende plaziert. Zur Messung des Gewebeerflächen- pO_2 wurde die auf der Kammerpräparation befindliche Plexiglasscheibe entfernt und das freiliegende Gewebeareal superfundiert (siehe 9.7.5.). Während kontinuierlicher Messung der rektalen und lokalen Temperatur (Type du3s; Ellab, Kopenhagen, Dänemark) wurde mit den Videoaufzeichnungen zur Erfassung der mikrohämodynamischen Parameter bzw. mit der Gewe-

be-
oberflächen- pO_2 -Messung begonnen. Anschließend wurden nach Gewebeerflächen- pO_2 -Messungen erneut die Blutgase bestimmt, das Präparationsareal mit dem Photomakroskop nach Injektion von FITC-Dextran 150.000 photographiert und das Gewicht der Tiere kontrolliert.

Vorgehen bei der Messung des Mikrohämatokrits

Diesen Tieren wurden 1 Stunde vor den Videoaufzeichnungen FITC-markierte Erythrozyten injiziert, so daß der Anteil der markierten Erythrozyten an der Gesamterthrozytenpopulation eines Tieres 1-2 % betrug. Hierzu wurden 0,2 ml (Hämatokrit 50 %) FITC-markierte Erythrozyten i.v. appliziert.

8.3. Versuchsgruppen

Wie bereits angedeutet, wurde ab dem zweiten postoperativen Tag zwischen zwei Gruppen von Versuchstieren unterschieden. 34 der 60 Tiere wurden Tumorzellen implantiert. Aus den beiden Versuchstiergruppen wurden drei Ver-

suchsgruppen gebildet: Eine Gruppe von 26 tumorfreien (Kontrollgewebe) und eine Gruppe von 34 tumortragenden Tieren, bei der zusätzlich zwischen Tumorgewebe und tumorumliegendem Gewebe unterschieden wurde. Entsprechend dieser Aufteilung wurde bei den makrohämodynamischen Messungen zwischen zwei Versuchsgruppen unterschieden, tumorfreien Tieren und tumortragenden Tieren, und bei den mikrohämodynamischen Messungen sowie den Gewebe- pO_2 -Messungen wurden drei Versuchsgruppen gebildet:

Versuchsgruppe I: Tumorfreies Gewebe

Versuchsgruppe II: Tumorumliegendes Gewebe

Versuchsgruppe III: Tumorgewebe

9. Meßmethoden und gemessene Parameter

9.1. Tägliche Gewichtskontrolle der Versuchstiere

Zur Bestimmung des Körpergewichtes wurden die Tieren aus den Einzelkäfigen entnommen und auf einer Laborwaage (1265 MP; Sartorius GmbH, Göttingen) plaziert. Die Gewichtsmessungen wurden im Abstand von 24 Stunden durchgeführt.

9.2. Makroskopische Photodokumentation

Zur täglichen Kontrolle der einzelnen Präparationen im Rahmen des 14-tägigen Versuchsablaufes und zur Dokumentation des Tumorwachstums wurden täglich photomakroskopische Aufnahmen des Kammerareales durchgeführt (siehe Abbildung 6 und 22). Hierzu wurde ein Photomakroskop (M 400, Wild, Heerbrugg, Schweiz), das mit einer Kaltlichtquelle (MTR 28; Wild, Heerbrugg, Schweiz) für Durchlichtbeleuchtung und einer Belichtungsautomatik (Photoautomat MPS 55/51, Wild, Heerbrugg, Schweiz) ausgestattet war, verwendet, sowie als Filmmaterial Kodak Ektachrome 400 (Eastman Kodak Company, Rochester, New York, USA).

9.3. Bestimmung des Tumorwachstums

Das Tumorwachstum wurde anhand der in 9.2. genannten photomakroskopischen Aufnahmen bestimmt. Hierzu wurden Photoabzüge in einer Größe von 13 x 18 cm angefertigt (Foto Stephan, München). Der mittlere Tumordurchmesser wurde täglich aus der viermaligen Bestimmung des Durchmessers nach jeweiliger Drehung des Meßlineals um 45 Winkelgrade und nachfolgender Mittelwertbildung berechnet.

9.4.1. Arterielle Blutgasanalysen

Zur Bestimmung der arteriellen Blutgasparameter wurden jeweils etwa 30-40 µl Blut über den arteriellen Katheter in eine heparinisierte Glaskapillare (Typ D 551/10/80, Radiometer, Kopenhagen) gefüllt. Die arteriellen Partialdrucke von Sauerstoff ($P_a O_2$) und Kohlendioxid ($P_a CO_2$) und der pH-Wert wurden polarographisch über ein Blutgasanalysegerät (AVL-939, AVL Medical Division, Graz, Österreich) gemessen. Arterielle Partialdruckwerte und pH-Wert wurden neben dem aktuellen Barometerdruck und der Körpertemperatur der Tiere in einen Rechner eingegeben (Rechner R6, Eschweiler und Co. KG, Kiel). Die normierten Werte des arteriellen pO_2 , pCO_2 und pH wurden auf dem zugehörigen Drucker registriert.

9.4.2. Hämatokrit

Blutproben wurden aus dem arteriellen Katheter in die o.e. heparinisierten Glaskapillaren abgenommen. Die Kapillarröhrchen wurden an einem Ende mit Kitt verschlossen, in einer Hämatokritzentrifuge (Hettich, Tuttlingen) zentrifugiert und der Hämatokritwert mit einem Hämatokritablesegerät (Hawksley-Hematocrit Reader, Gelman Hawksley Ltd., England) bestimmt.

9.5. Makrohämodynamische Messungen

Der arterielle Blutdruck (MAP) wurde mit einem Statham-Element (Typ P23 ID, Gould Inc., Oxnard, Ca., USA) und einer Druckmeßbrücke (Typ 863, Siemens AG, Erlangen) gemessen. Der Druck konnte während des Versuchs auf einem Oszilloskop (Siemens AG, Erlangen) kontinuierlich beobachtet werden, und wurde auf einem 6-Kanalschreiber (Oscilloreg, Siemens AG, Erlangen) fortlaufend registriert. Der arterielle Mitteldruck wurde anhand dieser Registrierungen durch Addition von systolischem und diastolischem Druck und Division durch 2 berechnet.

Der zentralvenöse Druck wurde durch ein identisches Vorgehen gemessen, jedoch wurde hierbei ein Statham-Druckelement für Messungen im Niederdruck-System (W 101, Gould Inc., Oxnard, Ca., USA) verwendet.

Die Herzfrequenz wurde anhand der am Schreiber registrierten phasischen Druckschwankungen des arteriellen Druckes bestimmt. In den Fällen, in denen die Herzfrequenz nicht aus diesen Druckschwankungen ermittelt werden konnte, wurde sie über die elektrokardiographische Ableitung gemessen. Hierzu wurden Klebeelektroden kranial und kaudal des Präparationsareals der Hautkammer platziert, das EKG über eine Meßbrücke (Typ 850, Siemens AG, Erlangen) erfaßt und auf dem o.e. 6-Kanalschreiber kontinuierlich registriert.

9.6.1. Aufbau des Mikrozirkulationsmeßplatzes

Eigens für diese BUntersuchungen wurde ein sogenannter Mikrozirkulationsmeßplatz am Institut für Chirurgische Forschung etabliert. Es wird im folgenden zwischen einer Aufnahmeeinheit und einer Auswerteeinheit unterschieden.

9.6.1.1. Aufnahmeeinheit

Zur intravitalmikroskopischen Untersuchung der Mikrozirkulation in der Kammerpräparation von Hamstern stand folgende Meßanordnung zur Verfügung. Auf einem horizontal beweglichen Kreuztisch (x-y-Kreuztisch) wurde mit Hilfe von kleinen Magneten das in Abbildung 10 dargestellte Plexiglasgestell befestigt. Zur Durchlichtbeleuchtung der Kammerpräparation wurde unter das Plexiglasgestell eine fiberoptische Lichtübertragung herangeführt und ebenfalls an einem Magnethalter (IFB, Hiddenhausen) fixiert. Das modifizierte Intravitalmikroskop (Orthoplan, Leitz GmbH, Wetzlar) war getrennt vom Kreuztisch an der Hydraulik eines Bohrmaschinengestells befestigt. Das Mikroskop war aus folgenden Einzelteilen aufgebaut: einem FSA-Tubus-GW, einem Vario-Tubus mit einer stufenlosen Vergrößerungsmöglichkeit von 1 bis 3,2 fach, verschiedenen Objektiven (GW 4x, 28; 10x, n.A. 0,22; 20x, n.A. 0,33; 25x, n.A. 60; 32x, n.A. 0,60) und einem Fluopak-Illuminator. Zur Feinfokussierung der jeweiligen Präparationsareale diente ein Mikro-Makrotrieb an dem das gesamte Mikroskop aufgehängt war. Dadurch wurde die Bewegung des gesamten Mikroskops in der vertikalen Achse (z-Achse) ermöglicht.

Die fiberoptische Durchlichtbeleuchtung (Kaltlichtlampe KL 150 B, Schott, Mainz) war insbesondere bei der zu Beginn der Versuchsserie verwendeten schwarz-weiß-Videotechnik ungeeignet, eine ausreichend kontrastreiche Darstellung der Mikrogefäße mit einem Durchmesser von weniger als 20 μm zu erzielen. Um vor allem morphometrische Messungen mit Hilfe des Vitalmikroskops durchführen zu können, wurde deshalb ein Fluoreszenzauflicht-Illuminator (Ploemopak, Leitz GmbH, Wetzlar) und ein I_2 -Blafilterblock an das Vitalmikroskop adaptiert (Abbildung 11). Im einfallenden Lichtstrahl wurde Licht unterhalb 450 nm und oberhalb 490 nm herausgefiltert, im emittierten Licht wurden Wellenlängen unter 510 nm eliminiert. Als Lichtquelle wurde eine 75 W Xenon-Lichtquelle (Xenon XBO-75, Leitz GmbH, Wetzlar) verwendet.

Die mikroskopischen Bilder wurden mit verschiedenen Videokameras aufgenommen. Bei Beginn der Studie wurde eine hochempfindliche schwarz-weiß-Rest-

VERSUCHSAUFBAU

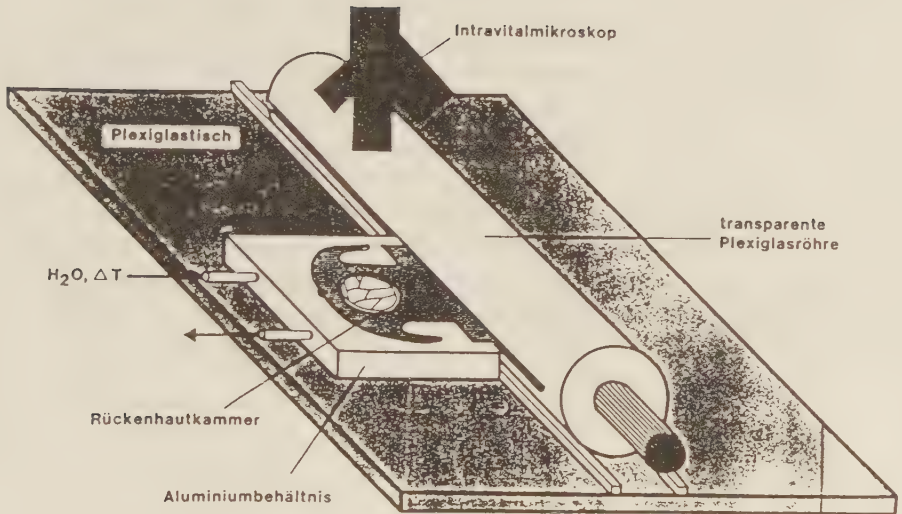


Abbildung 10:

Versuchsaufbau zur Intravitalmikroskopie: Der Hamster wird in einer transparenten Plastikröhre immobilisiert und die aus dem Längsschlitz der Plastikröhre herausragende Rückenhautkammer horizontal auf einem Aluminiumblock fixiert. Zur Konstanthaltung der Temperatur im Kammerareal wird dieses Behältnis mit vorgewärmtem Wasser perfundiert. Der Plexiglastisch wird unter dem Intravitalmikroskop auf dem X-Y-Kreuztisch festgeschraubt.

VIDEOFLUORESZENZMIKROSKOP

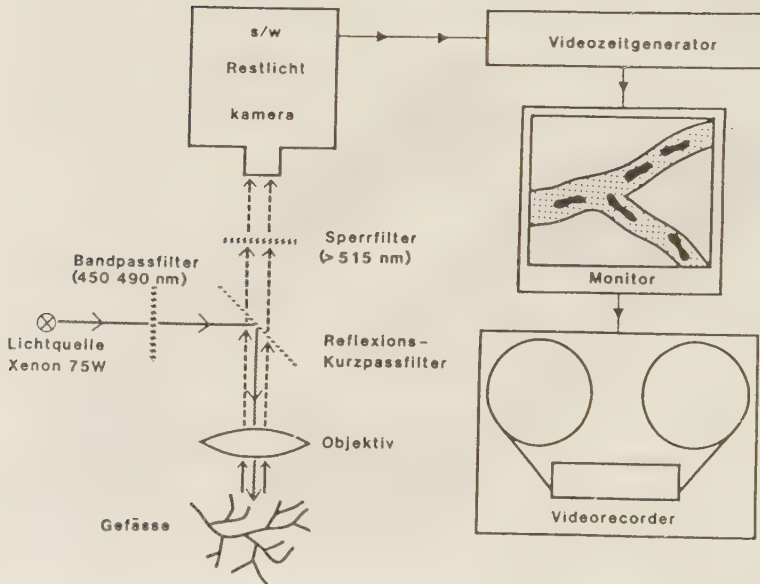


Abbildung 11:

Graphische Darstellung der Versuchsanordnung und der Gerätekonfigurationen zur Videofluoreszenzmikroskopie.

lichtkamera (Empfindlichkeit 10^{-3} lux, COHU 4400, SIT, Prospective measurements Inc., San Diego, Ca., USA) verwendet. Später kam eine schwarz-weiß-Restlichtkamera (WV 1900, National Panasonic, Japan) mit höherer Lichtempfindlichkeit von 10^{-4} lux zum Einsatz. Beide Kameras zeichneten mit einer Geschwindigkeit von 50 Halbbildern pro Sekunde auf. Nur mit Hilfe dieser beiden Kameras waren Aufzeichnungen von fluoreszenzmikroskopischen Bildern möglich. Über einen Videoselektor (VCS 50 M, Sony GmbH, München) konnte die jeweilige Kamera zugeschaltet werden. Über einen in das Videosignal eingeschalteten Videozeitgenerator (VTG 33; FOR-A-Company Ltd., Japan) wurden Datum und Uhrzeit in Abständen von 2/100-Sekunden mit auf das Bandgerät aufgezeichnet. Es wurden folgenden Aufzeichnungsgeräte verwendet: Initial ein 1/2"-Videoaufzeichnungsgerät (Videocorder, AV 3650 CE, Sony GmbH, München) und später ein 3/4"-Bandgerät (Sony-U-matic, VO-5800-PS, Sony GmbH, München). Über ein Mikrophon (Sony-ECM 16 T, Sony GmbH, München) am Videoaufzeichnungsgerät konnten wichtige Versuchsbedingungen bzw. Beobachtungen am Bildschirm gleichzeitig mit auf Band gespeichert werden.

9.6.1.2. Auswerteeinheit

Diese Gerätekonfiguration bestand aus den o.e. Aufzeichnungsgeräten und folgenden Meßgeräten (Abbildung 12). Der Bildschermontitor (Image-Shearing-Monitor, Modell 907; Instrumentation for Physiology and Medicine Inc., San Diego, Ca., USA), diente zur Bestimmung der Gefäßdurchmesser (siehe 9.6.3.2.). Die Blutzellgeschwindigkeitsmeßeinheit bestand aus dem Video-Photometric-Analyzer (Modell 202, Instrumentation for Physiology and Medicine Inc., San Diego, Ca., USA) und dem On-line-Cross-Correlator (Modell 102 B, Instrumentation for Physiology and Medicine Inc., San Diego, Ca., USA). Für on-line-Messungen der Blutzellgeschwindigkeit wurde zusätzlich eine Photodiode (Instrumentation for Physiology and Medicine Inc., San Diego, Ca., USA) in den Strahlengang zwischen Mikroskop und Videokamera gebracht. Die Signale der Photodiode wurden durch den Video-Photometric-Analyzer verarbeitet.

AUSWERTEEINHEIT DES MIKROZIRKULATIONSMESSPLATZES

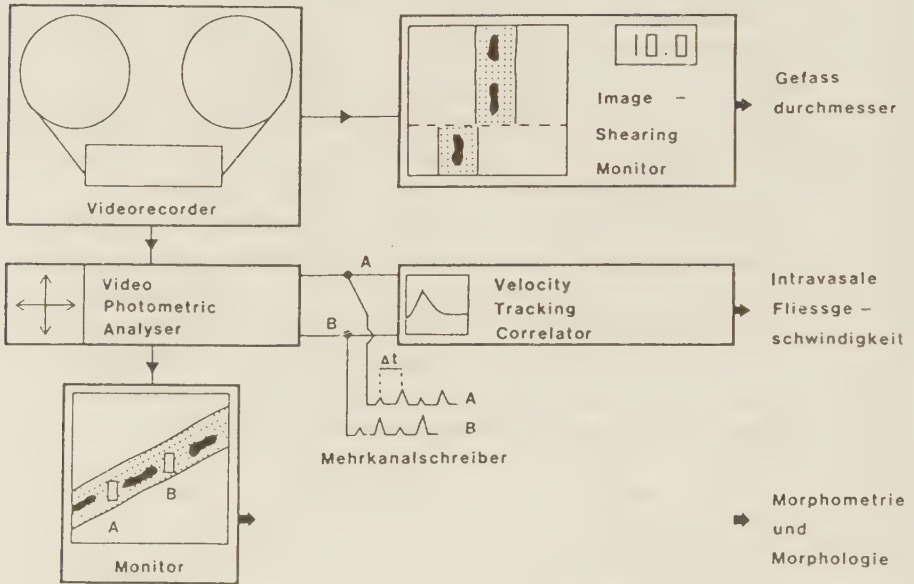


Abbildung 12:

Graphische Darstellung der Gerätekonfiguration zur Analyse der einzelnen mikrohämodynamischen Parameter vom Videoband.

9.6.2. Videomikroskopie

Voraussetzung zur Aufzeichnung von Gewebearealen war die videomikroskopische Aufnahme eines Mikrometer-Eichmaßstabes. Das Mikrometer (Leitz, München) wurde hierbei jeweils so aufgezeichnet, daß es sich horizontal oder vertikal auf dem Bildschirm darstellte (siehe 9.6.3.2. Messung der Gefäßdurchmesser). Hierdurch konnten frühzeitig geometrische Fehler entdeckt werden, die elektronisch oder durch mögliche Fehlstellungen der optischen Achse zwischen Mikroskop und Videokamera verursacht waren.

Nach endgültiger Prüfung der Präparation (siehe 5.) wurde am Tag 0 unter dem Intravitalmikroskop das jeweils aufzuzeichnende Gewebeareal in der Kammerpräparation ausgewählt. Bei den Tieren, denen noch am selben Tag Tumorzellen implantiert werden sollten, war das zentral gelegene Gebiet als das künftige Tumoreareal vorgesehen. Das künftig als tumorumliegendes Gewebeareal bezeichnete Gebiet wurde von einer zweiten Person durch geringes Drehen am Kreutzisch vorgegeben (Randomisierung der Gewebeareale). Dasselbe Vorgehen wurde für die Auswahl der Beobachtungsregionen in den Kontrollpräparationen gewählt. Es wurde darauf geachtet, daß die jeweiligen Transversalarteriolen mitaufgezeichnet wurden. Weiterhin war eine ausreichende Transparenz der aufzuzeichnenden Gewebeareale notwendig.

Zu Beginn wurde im Durchlicht eine on-line-Messung der Blutzellgeschwindigkeit in Arteriolen durchgeführt, um zu überprüfen, ob eine intravasale Fließgeschwindigkeit von mehr als 2,5 mm/sec vorlag (siehe 9.6.3.1. Messung der Blutzellgeschwindigkeit). Da, wie bereits erwähnt, sich die kleineren Gefäße im Durchlicht nicht kontrastreich abhoben, um morphometrische Messungen durchführen zu können, wurden Fluoreszenzmarker injiziert. Hierzu wurden bei Versuchsbeginn jeweils 0,2 ml einer 5 %igen FITC-Dextranlösung in 0,9% NaCl i.v. appliziert. Nach der Injektion wurde zwei Stunden gewartet, um die Präparation auf das Permeabilitätsverhalten hin zu prüfen.

Danach erfolgte eine Übersichtsaufzeichnung der gesamten Präparation mit dem Periplanokular (4 x GW; 0,28). Anschließend wurde das ausgewählte Gewebeareal für morphometrische Messungen mit dem 10 x-Objektiv aufgezeichnet und abschließend bei stärkster Vergrößerung (20 x-Objektiv und 2.0 am Va-

riotubus; bei späteren Versuchen 32 x-Objektiv und 1,2 bzw. 25 x-Wasserimmersionsobjektiv und 1,5) die Einzelgefäße zur Ermittlung von Gefäßdurchmesser und Blutzellgeschwindigkeit. Da bei diesen hohen Vergrößerungsstufen das einstrahlende Licht auf kleinere Gewebeareale gebündelt wurde und die numerische Apertur der Objektive größer war, resultierte eine höhere Fluoreszenzintensität, die zu ein überstrahlten Videobild führte. Um das Target der Videokameras vor diesem hohen Lichteinfall zu schützen und um phototoxische Effekte im Gewebe zu vermeiden, wurden deshalb Graufilter mit 25 %iger bzw. 50 %iger Transmission (Deutsche Balzers GmbH, Geisenheim/Rhein) in den emittierten Lichtstrahl der 75 W Xenonlampe gebracht.

9.6.3. Mikrohämodynamische intravitalmikroskopische Messungen, gemessene und errechnete Parameter

Mit Ausnahme der on-line Messung der Blutzellgeschwindigkeit in Gefäßen mit mehr als 20 μm Gefäßdurchmesser wurden alle weiteren Parameter off-line durch Analyse der Videobänder erhoben. Dies bot zunächst den Vorteil, daß sich der Untersucher vollkommen auf den Versuchsablauf konzentrieren konnte. Darüberhinaus wurden Wiederholungsmessungen möglich. Zum Teil konnten die Messungen von mehreren Personen überprüft werden bzw. mit anderen Meßmethoden verglichen werden. Im einzelnen wurden folgende Parameter gemessen.

9.6.3.1 Messung der Blutzellgeschwindigkeit

9.6.3.1.1. Historische Übersicht

Die Messung der Blutzellgeschwindigkeit wurde zur Bestimmung des Volumenflusses in den einzelnen Gefäßsegmenten herangezogen.

Die erste vereinfachte Bestimmung der Geschwindigkeit korpuskulärer Blutbestandteile führte der Holländer ANTONI VAN LEUWENHOOK bereits im Jahre 1673 durch, indem er mittels eines Mikroskops die Einzelzellen im Gefäß und

den dazwischenliegenden Plasmasaum verfolgte. Als Zeitmaß nahm er ein vier-silbiges holländisches Wort und als Abstandsmaß dienten ihm Sandkörner. Er bestimmte dabei eine mittlere Geschwindigkeit von 2 mm/sec (Zitat nach Slaaf et al., 1984).

Derartige visuelle Methoden mittels Mikroskopie wurden noch bis Mitte der sechziger Jahre angewendet (Übersicht bei Richardson, 1980; Monro, 1966). Hierzu zählte die direkte visuelle Erfassung, wie sie von VAN LEUWENHOOK und von HALES (Übersicht bei Monro, 1966) beschrieben wurde, die vergleichende visuelle Erfassung (Basler, 1921; Monro, 1966), der visuelle Eindruck eines "verstrichenen" Bildes, die sogenannte "visual streak image method" (Monro, 1966) und die stroboskopische Methode (Monro, 1966).

Seit Mitte der vierziger Jahre wurden photographische Methoden, wie die Mehrfachbildanalyse von Hochgeschwindigkeitsaufnahmen (Vogel, 1947; Bloch, 1962, Bugliarello und Hayden, 1962) und die Mikrokymographie (Hürthle, 1915; Basler, 1918; Castenholz, 1967; Röckemann, 1972, Asano et al., 1973) eingesetzt.

Photoelektronische Methoden fanden zunehmend mit Beginn des letzten Jahrzehnts Eingang in die vitalmikroskopische Mikrozirkulationsforschung. Neben Einschlitstechnik (Müller und Zahn, 1958; Harris et al., 1968; Johnson, 1973) und Zweischlitstechnik (Wayland und Johnson, 1967; Intaglietta und Tompkins, 1972a; Asano et al. 1973; Arfors et al. 1975) wurden räumliche Correlation (Goodman et al. 1973, 1974; Anliker et al. 1977), räumliche Filterung (Röckemann und Plesse, 1973), räumliche richtungssensible Filterung (Slaaf et al., 1979, 1981) und die Laserdoppler-Messung (Mishina et al., 1974; Horimoto, et al., 1979; Koyama et al., 1979) verwendet.

9.6.3.1.2. Zweischlitstechnik - "dual-slit-technique"

Zur Blutzellgeschwindigkeitsmessung verwendeten wir die Zweischlitzmethode ("dual-slit"), die nach dem zeitlichen Korrelationsverfahren arbeitet. Es existieren verschiedene Modifikationen der "dual-slit"-Methodik. Ursprünglich wurden Einzelphotonenzähler, sogenannte Photomultiplier (Wayland und Johnson, 1967) verwendet. Diese wurden durch Phototransistoren

(Wayland, 1973) oder Photodioden (Asano et al., 1964, Arfors et al., 1975) und durch Videodensitometer, der sogenannten Zweifenster-Technik (Silverman et al., 1972, Intaglietta et al., 1975; Butti et al., 1975) ersetzt. Die beiden letztgenannten Techniken wurden am Mikrozirkulationsmeßplatz etabliert. Während mit der Photodiode die Geschwindigkeiten bis zu 80 mm/sec in Gefäßen mit einem Durchmesser bis zu 100 µm gemessen werden konnten (spezielle Meßanordnung: Abbildung 13), waren mit Hilfe der Zwei-Fenster-Technik nur Geschwindigkeitsmessungen in Kapillaren bis zu einer Höchstgeschwindigkeit von 2,5 mm/sec anhand von Videoaufzeichnungen möglich.

9.6.3.1.3. Meßprinzip

Mittels Auflicht- oder Durchlichtmikroskopie wurde ein Bild projiziert, das über eine Videokamera auf Videoband gespeichert wurde. Durch in einem Mikrogefäß fließende korpuskuläre Bestandteile des Blutes wurden Änderungen der Lichtintensität, d.h. Lichtmodulationen, erzeugt. Positionierte man in den Verlauf eines Gefäßes zwei Photosensoren, wurden an diesen Sensoren durch die Lichtmodulationen analoge Voltänderungen von 300 - 500 mV erzeugt, die direkt proportional zur Helligkeitsänderung waren. Die Position der Photodiode im intermediären Bild zwischen Mikroskop und Kamera konnte hierbei über die Kamera kontrolliert werden. Die Position der Videodensitometer konnte bei der off-line-Analyse vom Videoband beliebig verändert werden.

Bei entsprechend eingeeichter Photodiode bzw. bei bekanntem Abstand Δs der sogenannten Fenster im Videobild konnte aus der Zeitverzögerung Δt mit Hilfe des Geschwindigkeitscomputers (velocity tracking correlator) die Geschwindigkeit direkt abgelesen werden. Der Korrelator basiert auf der empirischen Erfahrung, daß bei Geschwindigkeitsmessungen das Korrelogramm um seinen maximalen Wert nahezu symmetrisch angelegt ist. Mit Hilfe des Computers konnten 64 Punkte berechnet werden, d.h. es wurden damit Korrelationswerte von 64 Zeitverschiebungen wiedergegeben. Eine elektronische Änderung des Korrelogramms zwischen dem stromaufwärts gelegenen Signal A

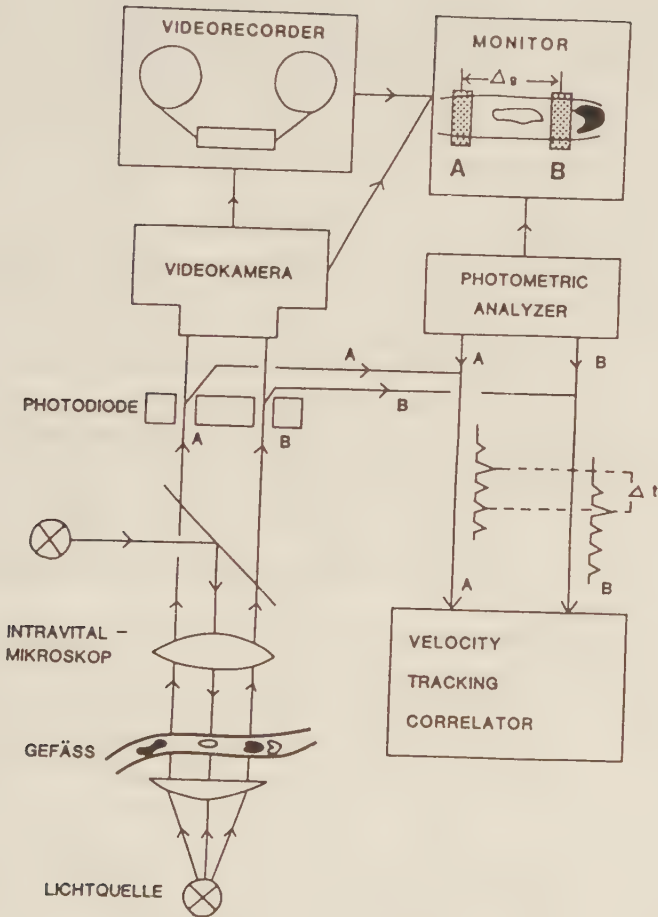


Abbildung 13:

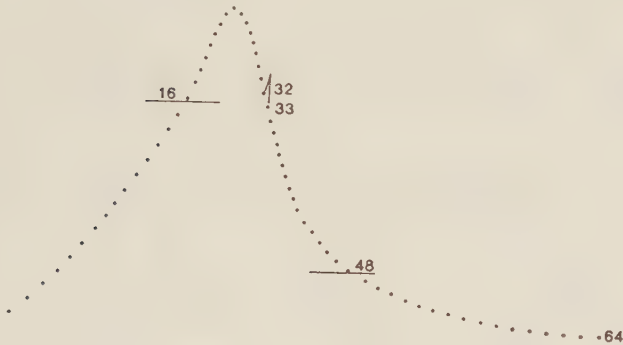
Graphische Darstellung der Versuchsanordnung und der Gerätekonfiguration zur direkten Messung der Blutzellgeschwindigkeit mittels einer Photodiode. Im Unterschied zur Videofluoreszenzmikroskopie und der Messung der Blutzellgeschwindigkeit mit der "Zwei-Fenster-Technik" können mit dieser Anordnung intravasale Fließgeschwindigkeiten von mehr als 2,5 mm/sec erfasst werden. Im Unterschied zu Abbildung 11 ist in den Strahlengang eine Photodiode eingebracht, deren Positionierung durch eine Schwarz-Weiß-Kamera (keine Restlichtkamera!) und einen Monitor kontrolliert wird. Im Gegensatz zur Verwendung von Auflicht bei Videofluoreszenzmikroskopie, muß das Gefäß mit Durchlicht beleuchtet werden.

und dem stromabwärts gelegenen Signal B erzeugte eine Verschiebung des gesamten Histogramms oder Korrelogramms. Es wurden vom Computer nur die Korrelationswerte von Punkt 16 und Punkt 48 verarbeitet, verglichen und durch Verschiebung der Verzögerung zwischen diesen beiden Eingangssignalen aneinander angeglichen. Dies wurde vom Untersucher erreicht, indem der Spitzenpunkt ("peak") auf die Spitze des Korrelogramms einjustiert wurde (Abbildung 14).

Um ein möglichst gutes Signal-Rausch-Verhältnis zu erhalten, mußte das bestmögliche Verhältnis von Beleuchtung zur Sensitivität des Photosensors erzielt werden. Die Messung mit einer Photodiode erforderte sehr viel Licht, d.h. daß für diese Messungen nur mit Durchlicht gearbeitet werden konnte. Als Lichtquellen für derartige Messungen haben sich deshalb Gleichstromlichtquellen bewährt. Einige Autoren verwendeten darüber hinaus Schmalbandfilter im Bereich der Soretbande (416 nm), um damit den Kontrast und das Signal-Rausch-Verhältnis zu verbessern. Wir verwendeten eine Kaltlichtquelle (KL 150 B, Schott, Mainz). Das Licht wurde über einen flexiblen Lichtleiter und einen daran adaptierten Kondensor an das Präparationsareal herangeführt. Dies genügte den Anforderungen der on-line-Blutzellgeschwindigkeitsmessung.

Um kontrastreiche Hell-Dunkel-Unterschiede im Videobild zu erzeugen, wurde für die Geschwindigkeitsmessung vom Videoband die Auflichtfluoreszenzmikroskopie verwendet. Da z.B. ein Erythrozyt oder eine Lichtmodulation mindestens einmal von jedem Photosensor auf einem Videobild erfaßt werden mußte, war die maximale meßbare Geschwindigkeit einerseits bestimmt durch die Bildfrequenz der in Europa üblichen Fernsehtechnik mit 50 Hz, sowie durch die Korrelationslänge L, d.h. durch den Abstand der Photosensoren während der Messung. Bei typischen Werten von L um 10 - 100 μ m betrug damit die maximale Geschwindigkeit in linearen Einheiten bei dem vorliegenden System mit 50 Hz, 25 L, d.h. 250 - 2500 mm/sec (Arfors et al., 1975).

KREUZKORRELATIONSKORRELOGRAMM VOR ABGLEICH



NACH ABGLEICH

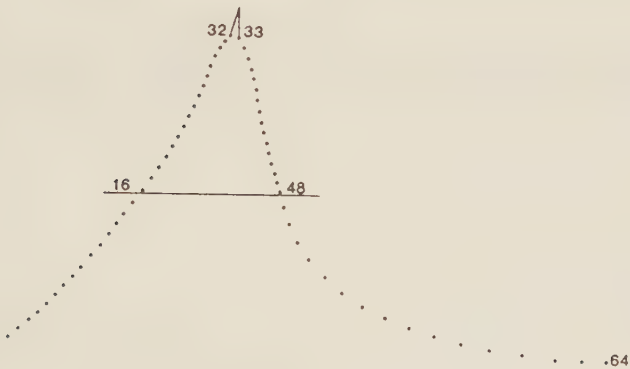


Abbildung 14:

Diese Abbildung gibt ein Kreuzkorrelationskorrelogramm des Geschwindigkeitsmeßcomputers vor (a) und nach (b) Angleichen der Punkte 16 und 48 wieder. Wesentliches Kriterium für den Untersucher ist die Einjustierung des nach oben stehenden spitzwinkligen Dreiecks auf die Spitze des Kreuzkorrelationskorrelogramms, wodurch die beiden genannten Punkte angeglichen werden.

9.6.3.1.4. Zweifenstertechnik - "dual-window-technique"; Einfluß von Sensorgröße und Sensorabstand

Wie aus der Originalabbildung der Arbeit von INTAGLIETTA et al. zu entnehmen (Intaglietta et al., 1975), ist die Kreuzkorrelation eine Funktion der Sensoren, d.h. der Fenstergröße und des Fensterabstandes (Abbildung 15). Punkt A sei beispielsweise ein sich bewegendes Erythrozyt, der die beiden Detektoren passiert. Im Fall A stehen die Detektoren sehr eng zusammen, dies optimiert normalerweise die Kreuzkorrelation, es wird jedoch die Detektion wegen der hinzukommenden Autokorrelation vermindert. Im Beispiel B befinden sich die Detektoren in einem Abstand, der der Länge des sich bewegendes Partikels entspricht. Dadurch wird die Autokorrelation auf 0 minimiert. Verminderung der Detektorengröße in Bewegungsrichtung führt zu einer erhöhten Detektion, wie auch in Beispiel D bei erhöhter Geschwindigkeit des Partikels wiedergegeben. Voraussetzung ist jedoch, daß dieser Partikel innerhalb eines Bildes erfaßt werden kann.

Elektronisches Rauschen und hydraulisches Rauschen, d.h. die relative und gleichmäßige Bewegung der Blutzellen während der Passage zwischen den beiden Sensoren beeinflussten die Signale und verminderten die Korrelation mit ansteigendem Sensorenabstand. Deshalb war es nötig, die Sensoren so nahe wie möglich aneinander zu positionieren.

9.6.3.1.5. Eichung des Meßsystems

Um verwertbare Meßergebnisse zu erzielen, war eine Eichung beider Meßsysteme unabdingbare Voraussetzung. Als Kalibrierungssystem wurde eine kreisrunde mit konstanter Geschwindigkeit rotierende Aluminium-Scheibe (Laborwerkstätten, Klinikum Großhadern) verwendet, die unter dem Mikroskop zentriert wurde (Lipowsky et al., 1980). Auf der Scheibe waren in Abständen von 5 mm Kreise eingefräst (Fräsbreite: 0,5 mm). In die Fräslinien wurde verdünntes Blut aufgebracht und getrocknet. Die Scheibe wurde durch einen Antriebsmotor in eine konstante Rotationsgeschwindigkeit versetzt. Bei be-

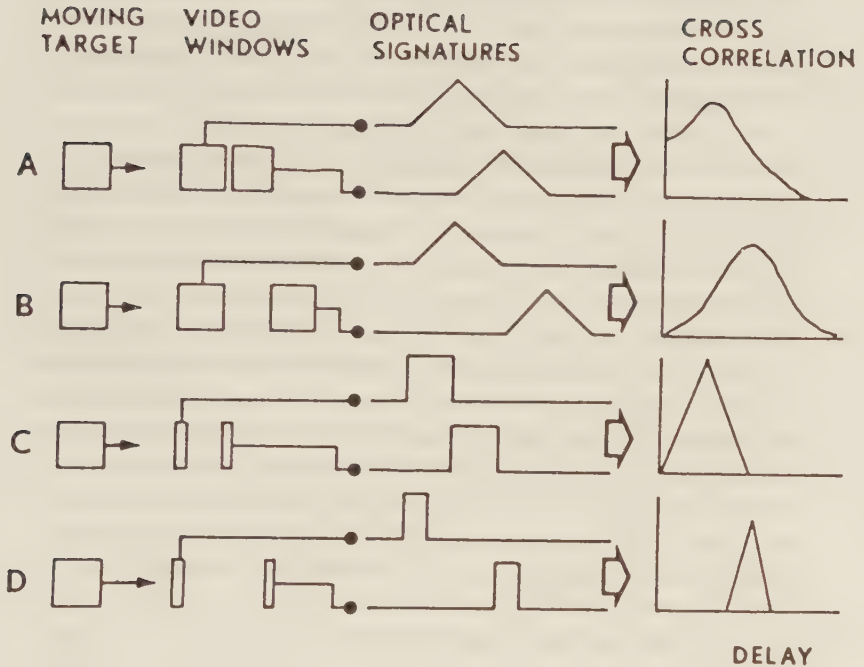


Abbildung 15:

Diese Abbildung aus der Originalarbeit von INTAGLIETTA et al. zeigt den Einfluß von Fenstergröße und Fensterabstand auf die Kreuzkorrelation (Intaglietta et al., 1974). Der Abstand der beiden Fenster bestimmt die Größe der Autokorrelation aufgrund der Überlappung (A und B). Die Entfernung der beiden Sensoren bestimmt die Schärfe des Spitzenwertes (A, B versus C, D).

kannter Umdrehung und vorgegebenem Kreisdurchmesser konnte die Geschwindigkeit eines beliebigen Kreispunktes genau berechnet werden. Die mit dem Geschwindigkeitsmeßcomputer (velocity-tracking-correlator) erhaltenen Meßwerte wurden diesen rechnerischen Werten solange angeglichen, bis ermittelte und errechnete Werte über das zu erfassende Geschwindigkeitsspektrum von 0,05 mm/sec bis 10 mm/sec nahezu identisch waren.

Erneut wurde dann von verschiedenen Personen eine in-vitro Messung mit dieser Eichscheibe wiederholt. Wurden die Meßwerte verschiedener Meßpersonen gegen die errechneten aufgetragen, so betrug der Korrelationskoeffizient bei idealer Eineichung des Systems 0,99. Die Richtigkeit, d.h. die exakte quantitative Erfassung in-vitro konnte damit mit einer maximalen Abweichung von 6,5 % angegeben werden. Damit lag der von uns ermittelte Wert nur geringgradig über den in der Literatur berichteten Angaben (Lipowsky und Zweifach, 1978). Als Maß für die Präzision, d.h. die Genauigkeit oder die Reproduzierbarkeit in-vitro wurde der Gesamtfehler nach McFARREN et al. berechnet, der sich aus der Addition des zufälligen und systematischen Fehlers ergibt (McFarren et al., 1970). Er lag bei maximal 24%. Demnach war diese Geschwindigkeitsmeßmethode für die in-vitro Messung eines kontinuierlichen Flusses als sehr gut einzustufen (Grenzwert: 25 %).

9.6.3.1.6. Diskussion dieser Meßmethodik

Sind diese in-vitro Messungen von kontinuierlichen Geschwindigkeiten mit einer rotierenden Scheibe ohne weiteres auf eine in-vivo Situation übertragbar, d.h. wie sind Richtigkeit und Präzision der Messung in-vivo einzuschätzen?

Da weder für die on-line noch für die off-line Messung eine absolute Referenz für die Richtigkeit der Messung existiert, kann an dieser Stelle nur auf die von HOLLIGER et al. durchgeführten ausführlichen Studien zu diesen Meßmethoden verwiesen werden (Holliger et al., 1975). Er berichtete, daß die Richtigkeit der Meßmethoden bei günstigsten Bedingungen innerhalb von 15% liegt.

Über die Reproduzierbarkeit, d.h. die Präzision läßt sich auf Grund des dy-

namischen Geschehens für die on-line Messung der Fließgeschwindigkeiten keine exakte Aussage machen, da eine on-line Einzelmessung nicht wiederholbar ist. Es besteht jedoch durchaus Grund zu der Annahme, daß bei kontinuierlichen Fließgeschwindigkeiten die Präzision der in-vitro Messungen auf die in-vivo Situation übertragbar ist. Liegt jedoch ein durch Vasomotion oder Herzfrequenz induzierter pulsativer Fluß in den Mikrogefäßen vor, kann dies mit der vorliegenden Meßmethodik registriert werden, an der Anzeige des Geschwindigkeitsmeßcomputers wird jedoch sofort der gemittelte Meßwert wiedergegeben (Intaglietta und Tompkins, 1972a; 1972b).

Hinsichtlich der off-line Messung mit Hilfe der Videodensitometer wurden anhand der Videobänder intraindividuelle Wiederholungsmessungen und interindividuelle Messungen an identischen Gefäßsegmenten zu den jeweils gleichen Zeitpunkten durchgeführt. Wir konnten bei zwei Personen bei der intraindividuellen Messung einen maximalen Gesamtfehler von 33%, bzw. 37% ermitteln. Damit war die Messung als gut einzustufen. Bei Messungen der interindividuellen Varianz wurden als maximale Gesamtfehler 37 % und 42 % ermittelt, d.h. es lag eine ausreichende Präzision der off-line Messung vor. Wie bereits von INTAGLIETTA et al. und anderen Autoren beschrieben, wird mit dieser Methode ein mittlerer Geschwindigkeitsmeßwert der fließenden zellulären Blutbestandteile gemessen und ist bei intermittierendem Fluß, d.h. bei steil ansteigenden Fließgeschwindigkeiten mit einer Fehlerquote bis zu 30% behaftet (Intaglietta et al., 1975; Gaethgens, 1977; Slaaf et al., 1984).

Ein direkter Vergleich dieser Methode mit einer Bild-zu-Bild-Analyse und einem von Hand ausgewerteten Vergleich mit auf Schreiber registrierten Densitometriesignalen zeigte, daß damit vor allem niedrigere Spitzenwerte gemessen wurden. In-vitro Versuche zum Driftverhalten zeigten, daß bei dem von uns verwendeten Gerät die Drift vernachlässigbar gering war, d.h. die Drift im Rahmen der Meßungenauigkeit lag. Die Frequenzantwort des Systems lag bei 3 - 5 Hz.

9.6.3.1.7. Wertung der verwendeten Geschwindigkeitsmeßmethoden

Die on-line Messung mit der Photodiode hat den Vorteil, daß Geschwindigkeiten bis zu 100 mm/sec in Gefäßen bis zu 100 μ m Durchmesser gemessen werden können. Dem stehen folgende Nachteile gegenüber: Bei völliger Immobilisation der Präparation muß on-line gemessen werden und die Methode kann nur an Durchlichtpräparationen, wie z.B. dem Omentum oder dem Mesenterium und der Hamsterrückenhautkammerpräparation verwendet werden. Nach bisherigen Darstellungen können nur drei Messungen gleichzeitig durchgeführt werden (Ley et al., 1985), und bei Geschwindigkeitsänderungen erfolgt eine Mittelung der Geschwindigkeitsmeßwerte, die eine Unterschätzung der Spitzenwerte um 30% beinhaltet. Es können keine intermittierenden Fließgeschwindigkeiten gemessen werden und es kann keine Messung der Fließgeschwindigkeit bei Fließumkehr durchgeführt werden.

Die Vorteile der Videodensitometrie sind darin zu sehen, daß es sich um eine off-line Messung handelt und deshalb mehrere Gefäße im beobachteten Areal gleichzeitig erfaßt werden können und dies mit einer erheblichen Zeitersparnis verbunden ist (Butti et al., 1975). Die Messung ist beliebig häufig wiederholbar und kann auch von anderen Untersuchern wiederholt werden. Bei kontinuierlichem Fluß arbeitet sie in-vitro und in-vivo präzise. Wie bei der on-line Messung ist auch die Notwendigkeit der Immobilisation als Nachteil anzusehen. Es können mit Hilfe der konventionellen Videotechniken in Europa nur Geschwindigkeiten bis zu 2,5 mm/sec gemessen werden. Mit einer Kamera mit einer höheren Bildfrequenz könnte die maximal meßbare Geschwindigkeit jedoch bis zu 10 mm/sec betragen. (Arfors et al., 1975). Die Geschwindigkeiten können bei Zuhilfenahme der Fluoreszenzmikroskopie nur in kleineren arteriolen, kapillären und venulären Gefäßen erfaßt werden. Bei sich ändernden Fließgeschwindigkeiten erfolgt wie bei der on-line Messung eine Mittelung des Flusses. Ebenso kann keine Flußumkehr und kein intermittierender Fluß gemessen werden. Die Richtigkeit der Methodik wird mit 16% angegeben.

9.6.3.2. Quantifizierung der Gefäßdurchmesser

Die Gefäßdurchmesser konnten mit der vorhandenen Ausrüstung mittels zweier Methoden bestimmt werden:

- mit dem Bildschirmmonitor und
- direkt vom Fernsehmonitor mit Lineal und Zirkel.

Vorzugsweise wurde die Bildschertechnik verwendet. Der Monitor (Image-Shearing-Monitor, Model 907; Instrumentation for Physiology and Medicine Inc., San Diego Ca., USA) erlaubte neben der elektronischen Scherung des Bildes in der horizontalen Ebene auch die Rotation und eine maximale 5-fache Vergrößerung des Videobildes. Somit konnte durch Vertikalstellung und Vergrößerung des zu messenden Gefäßes dessen Durchmesser quantifiziert werden. Um bei diesem Meßvorgang die größtmögliche Präzision zu erzielen, wurde das Gerät mit Hilfe eines Mikrometers (Leitz GmbH, Wetzlar) kalibriert, das zu Beginn eines jeden Versuchs aufgezeichnet worden war. Um gerätebedingte Meßfehler bei Rotation des Videobildes auszuschließen, wurde nach der Kalibrierung des Monitors, das in horizontaler Bildschirmenebene aufgezeichneten Mikrometer mit dem in der vertikalen Ebene aufgenommenen Mikrometer nach dessen Rotation um 90 Grad in die Horizontale verglichen. Konnte keine Übereinstimmung erzielt werden, mußte die Bildschirmgeometrie elektronisch nachgetrimmt werden. Nach endgültiger Kalibrierung konnten die Gefäßdurchmesser digital mit einer Genauigkeit von 0,1 um abgelesen werden.

Ein Vergleich dieser Meßwerte mit den von Hand an einem größeren Bildschirm gemessenen Durchmessern wurde mehrfach durchgeführt. Gleichzeitig wurden diese auch per Hand von dem größeren Monitor mit Lineal und Zirkel wiederholt.

Der Korrelationskoeffizient der methodisch bedingten Meßunterschiede lag bei $r = 0,95$, der intraindividuelle bei $r = 0,98$, der interindividuelle bei $r = 0,96$ für beide Methoden.

9.6.3.3. Berechnung des segmentalen Volumenflusses

Der Volumenfluß in einer Röhre wird üblicherweise bestimmt durch Multiplikation von Fließgeschwindigkeit x Röhrenquerschnitt. Da die Geschwindigkeit mit den dargestellten Meßsystemen im Zentralstrom bestimmt wird, findet eine Überschätzung der Fließgeschwindigkeit im Zentralstrom gegenüber der Randgeschwindigkeit um den Faktor 1,6 statt. Dies wurde übereinstimmend von mehreren Autoren berichtet und wurde nach den Erstbeschreibern als Baker-Wayland Proportionalitätsfaktor bezeichnet (Baker and Wayland, 1974; Lipowsky und Zweifach, 1978; Harper and Bohlen, 1983). LEE und Mitarbeiter berichteten über einen Faktor von 2 in Gefäßen mit einem Gefäßdurchmesser von 40 - 470 μm (Lee et al. 1983). Für Gefäße mit einem Gefäßdurchmesser unter 10 μm gaben LIPOWSKY und ZWEIFACH einen Faktor von 1,3 an (Lipowsky u. Zweifach, 1978). In der Volumenflußberechnung der vorliegenden Experimente wurde der Faktor 1,6 berücksichtigt, da die Mehrzahl der im Verlauf dieser Experimente ermittelten Gefäßdurchmesser zwischen 10 und 40 μm lag. Ein systematischer Fehler bei der Volumenflußmessung in Kapillaren wurde damit in Kauf genommen. Der Volumenfluß berechnete sich damit aus der Formel:

$$Q = v/1,6 \times (d/2)^2$$

9.6.3.4. Messung des Mikrohämatokrites

9.6.3.4.1. Bestimmung der markierten Erythrozytenfraktion

Wie in 8.2. dargestellt wurde diesen Versuchstieren, die zur Messung des Mikrohämatokrites (H_{micro}) verwendet wurden (Kontrollgruppe: n = 3; Tumormorgruppe: Tag 4: n = 3, Tag 8: n = 3), 1 Stunde vor den Videoaufzeichnungen 0.2 ml einer in Natriumchlorid gelösten markierten Erythrozytensuspension intravasal verabreicht. Nach Beendigung der Videoaufzeichnungen wurde den Versuchstieren aus dem arteriellen Katheter Blut entnommen und der systemische Hämatokrit (H_{syst}) und der Anteil der markierten Erythrozyten an

der Gesamterythrozytenpopulation bestimmt. Die Messung der markierten Erythrozytenfraktion ging in die Berechnung des Erythrozytenflusses (siehe 9.6.3.4.3.) und des Mikrohämatokrites (siehe 9.6.3.4.5.) ein. Am Versuchsende wurden die Tiere getötet, da sie wegen der mehrtägig rezirkulierenden Erythrozyten für weitere Mikrohämatokritmessungen nicht mehr in Frage kamen.

Es wurde eine Verdünnung der entnommenen Erythrozyten im Verhältnis 1:200 bzw. 1:10 hergestellt. Die Anzahl nicht-markierter Erythrozyten konnte durch Zählen der Erythrozyten in der Neubauer-Kammer bei einer 1:200 Verdünnung bestimmt werden, während die Zahl der markierten Erythrozyten durch Auszählen von 40 Feldern bei einer Verdünnung von 1:10 unter dem Videomikroskop (siehe 9.6.2.) bestimmt wurde, wobei das 32x-Objektiv verwendet wurde um eine Vergrößerung auf dem Monitor von 1100x zu erzielen. Die Erythrozytenfraktion wurde nach folgender Formel bestimmt:

$$EF_{\text{mark}} = \text{markierte Erythrozyten}/\mu\text{l} / \text{unmarkierte Erys}/\mu\text{l}$$

9.6.3.4.2. Fließgeschwindigkeitsmessung

In den einzelnen Gefäßabschnitten wurde die Fließgeschwindigkeit durch die Bild-zu-Bild-Analyse von Videobildern ermittelt. Bei bekannter Vergrößerung konnte die Wegstrecke der markierten Erythrozyten genau bestimmt werden. Der Zeitabstand von Videobild zu Videobild war 2/100 sec. Damit konnte die Wegstrecke der markierten Erythrozyten pro Zeiteinheit berechnet werden. Voraussetzung für eine derartige Messung war jedoch, daß die Erythrozyten auf dem Bildschirm eine geradlinige Wegstrecke zurücklegten.

In jedem einzelnen Gefäßsegment wurde die Fließgeschwindigkeit von mindestens 50 markierten Erythrozyten gemessen und daraus die jeweils herrschende durchschnittliche Fließgeschwindigkeit (v) in diesem Gefäßabschnitt berechnet.

9.6.3.4.3. Berechnung des Erythrozytenflusses

Zunächst wurde die Menge der vorbeifließenden markierten Erythrozyten pro Zeiteinheit ausgezählt. Die einzelnen Gefäßsegmente wurden solange verfolgt, bis 100 markierte Erythrozyten das vorgegebene Gefäßsegment passiert hatten. Damit konnte der segmentale Erythrozytenfluß nach folgender Formel berechnet werden:

$$F_{\text{Ery}} = 100 \times 1/EF_{\text{mark}}$$

9.6.3.4.4. Quantitative Erfassung der Gefäßdurchmesser

Die Quantifizierung der Gefäßdurchmesser in diesen Versuchen erfolgte analog Bzu dem in 9.6.3.2. angegebenen Vorgehen.

9.6.3.4.5. Berechnung des Mikrohämatokrites

Der segmentale Mikrohämatokrit (H_{micro}) wurde nach der von SARELIUS und DULING angegebenen Gleichung berechnet (Sarelius und Duling, 1982):

$$H_{\text{micro}} = F_{\text{Ery}} \times MCV \times 100/v \times \pi \times (d/2)^2$$

In diese Gleichung gehen die Größen Erythrozytenfluß (F_{Ery}), Erythrozytenfließgeschwindigkeit (v) und Gefäßquerschnitt ($\pi \times (d/2)^2$; d = Gefäßdurchmesser) ein, sowie das mittlere korpuskuläre Volumen der Erythrozyten (MCV). Dieses lag bei den in dieser Studie verwendeten Hamstererythrozyten bei $62,3 \mu\text{m}^3$ und stimmte damit mit den in der Literatur angegebenen Werten überein (Desai, 1955; House et al., 1961; Altmann und Dittmer, 1974).

9.6.3.5. Morphometrische Messungen

9.6.3.5.1. Messung der Kapillarlängen

Die Kapillarlängen in den einzelnen Gewebearealen wurden anhand von Videostandbildern ermittelt. Hierbei wurde die Länge einer Kapillare von Abzweigung zu Abzweigung bestimmt. Daraus konnte die mittlere Kapillarlänge für die einzelnen Gewebeareale errechnet werden.

9.6.3.5.2. Berechnung der Kapillardichte

Zur Bestimmung der Kapillardichte wurden die von SCHMID-SCHÖNBEIN et al. modifizierten stereologischen Prinzipien nach UNDERWOOD herangezogen (Schmid-Schönbein et al., 1977; Underwood, 1970). Hierzu wurde über ein direkt abgezeichnetes Kapillarnetz der terminalen Strombahn eine transparente Gitterstruktur bestehend aus Quadraten mit jeweils 10 mm Kantenlänge gelegt. Nach Auszählen der Schnittpunkte N zwischen Kapillaren und Gitterstruktur konnte die Kapillardichte pro Gewebeeinheit L_A nach folgender Formel berechnet werden:

$$L_A = \pi \times N \times V / \sum L \text{ (mm/mm}^2 \text{)}$$

In diese Formel gehen V als Vergrößerung und L als die Summe der Gitterlinien, die über den Gewebeausschnitt projiziert wurden, ein (Abbildung 16). Das Kapillarnetz wurde auf zwei verschiedene Arten bestimmt. Die mit der Restlichtkamera aufgezeichneten fluoreszenzmikroskopischen Bilder wurden vom Monitor abphotographiert. Aus ca. 30 Ausschnitten von $300 \times 200 \mu\text{m}$ aus der terminalen Strombahn wurde eine Photomontage von etwa $1000 \times 1500 \mu\text{m}$ zusammengestellt. In den späteren Versuchen wurde zugunsten eines direkten Abbausens des Kapillarnetzwerkes vom Monitor auf die Erstellung einer Photomontage verzichtet.

BESTIMMUNG DER KAPILLARDICHTE IM GEWEBE

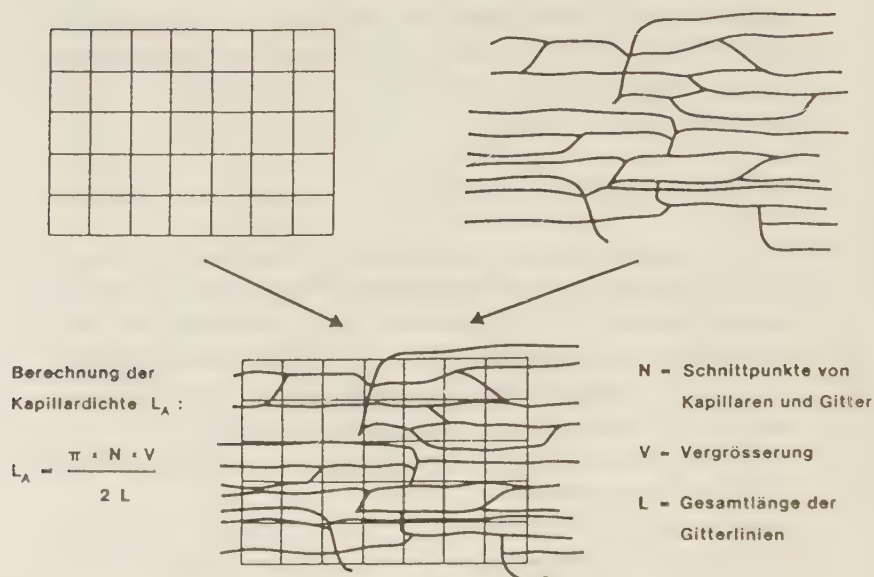


Abbildung 16:

Schematische Darstellung zur Bestimmung der Kapillardichte im Gewebe. Über eine Photomontage der mit FITC-Dextran 150 000 videomikroskopisch dargestellten Kapillaren wird eine Gitterstruktur gelegt und die Schnittpunkte zwischen Gitter und Photomontage ausgezählt. Die Berechnung der Kapillardichte erfolgt nach der von SCHMID-SCHOENBEIN et al. angegebenen Formel (Schmid-Schoenbein et al., 1977).

Plasmaperfundierte vs Erythrozytenperfundierte Kapillaren

Da die nach obigem Muster bestimmte Kapillardichte nur den Wert für die mit Plasma durchströmten, d.h. mit FITC-Dextran 150 perfundierten Kapillaren wiedergibt, wurden in einem zusätzlichen Arbeitsschritt nur die Kapillaren eingezeichnet, die von Erythrozyten perfundiert wurden. Dies geschah unter der Annahme, daß nur diese Kapillaren den O_2 -Antransport gewährleisten und damit für die nutritiven Bedürfnisse in Betracht kommen.

9.6.3.5.3. Berechnung der Kapillaroberfläche

Die Kapillaroberfläche pro Gewebereinheit wurde aus der Kapillardichte und einem mittleren Kapillardurchmesser der Kapillaren in dem Areal berechnet. Zur Bestimmung des mittleren Kapillardurchmessers mußten mindesten 20 - 30 zufällig ausgewählte Messungen des Kapillardurchmessers aus diesem Gewebes-areal vorliegen. Die Kapillaroberfläche konnte damit nach folgender Formel bestimmt werden:

$$S_A = d \times \pi \times L_A$$

9.6.3.6. Untersuchung der Permeabilität für Makromoleküle

In Anlehnung an Studien an den Hamsterbackentaschen (Svensjö et al., 1977; 1979), an den Piagefäßen von Katzen (Wahl et al., 1985) und an Untersuchungen an der Hamsterhautfalte aus der eigenen Arbeitsgruppe (Endrich et al., 1982) wurden Untersuchungen über das Permeabilitätsverhalten für Makromoleküle durchgeführt. Als Marker für makromolekulare Permeabilitätsänderungen wurde FITC-Dextran mit einem Molekulargewicht von 150.000 Dalton verwendet. Fluoreszenzmakroskopische Aufnahmen wurden mit dem bereits beschriebenen Photomakroskop gewonnen. Als Lichtquelle diente eine Hochdruckquecksilberdampf Lampe (HBO-50). Der verwendete Filtersatz entsprach dem des Intravitalmikroskops (I_2 , Leitz, Wetzlar).

Die Permeabilitätsänderungen wurden in Anlehnung an die von WAHL et al. angegebene Klassifizierung bestimmt (Wahl et al., 1985), wobei die Austritte aus dem Intravasalraum wie folgt eingeordnet wurden:

- Stadium 0 keine Extravasationen des Fluoreszenzmarkers
- Stadium 1 einzelne und deutlich abgrenzbare fluoreszierende Herde
- Stadium 2 diffuse und konfluierende Fluoreszenz.

9.6.3.7. Vorversuche zum Einfluß der Beleuchtung ohne und mit Fluoreszenzmarker

Nachdem an Piagefäßen von Mäusen (Rosenblum und Sabban, 1977) und an Hamsterbackentaschengefäßen (Herrmann, 1983) Thrombozytenaggregationen in Arteriolen nach FITC-Gaben und Anregung mit dem Licht einer Quecksilberdampflampe beobachtet wurden, erschien es angebracht, derartige Voruntersuchungen in der Hautkammerpräparation der Hamster durchzuführen. Die Beleuchtung im Videomikroskop mittels Durchlicht (Kaltlichtquelle) bzw. fluoreszenzanregendem Auflicht (Xenon, XBO-75 W), sowie entsprechende Beleuchtung am Photomakroskop (Auflicht: HBO-50 W) hatten selbst keinen Effekt, weder bei kontinuierlicher noch bei diskontinuierlicher 2-stündiger Beleuchtung (jeweils $n = 2$ Tiere).

Nach Applikation von FITC-Dextran 150 konnten unter Halogen-Durchlichtbeleuchtung keine Veränderungen der Vasomotorik und der Permeabilität für Makromoleküle erzeugt werden.

Bei fluoreszenzanregendem Auflicht im Mikroskop konnten bei kontinuierlicher, über eine Stunde anhaltender, Applikation von Licht auch keine Effekte hervorgerufen werden. Diese Untersuchungen wurden bei unterschiedlichen Vergrößerungen durchgeführt. Die einzelnen Beleuchtungsdichten für die Objektive lagen bei: $4 \times \text{GW} - 40 \text{ mW/cm}^2$; $20 \times - 100 \text{ mW/cm}^2$; $32 \times - 200 \text{ mW/cm}^2$. Eine 20-minütige Beleuchtung einzelner Areale, bzw. einzelner Gefäße führte zu keiner Extravasation in diesen Bereichen.

Fluoreszenzauflicht in einer Beleuchtungsdosis von 20 mW/cm^2 führte bei

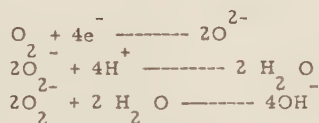
zwei Präparationen bei kontinuierlicher Beleuchtung mit dem Licht einer Quecksilberdampfampe (HBO - 50 W) nach etwa 50 bzw. 65 min zur Extravasation des Plasmamarkers aus den Venolen. Thrombozytenaggregationen wurden nicht beobachtet. Nachdem für Permeabilitätsstudien nur alle 4 Tage FITC-Dextran appliziert wurde und die Aufnahmen nicht mehr als zwei Minuten Beleuchtungszeit beanspruchten, waren keine der soeben beschriebenen Auswirkungen auf die Mikrozirkulation zu erwarten.

9.7. Messung des regionalen Gewebeoberflächensauerstoffpartialdruckes

Um einen Anhalt über den Zustand der Oxygenation der verschiedenen Gewebeareale (Hautmuskel, Tumor, tumorumliegendes Gewebe) zu erhalten, wurden die regionalen Oberflächengewebesauerstoffpartialdrucke mit einer 8-Kanal-Platinmehrdrahtoberflächenelektrode gemessen (Kessler und Lübbers, 1966; Kessler und Grunewald, 1969; Lübbers, 1969; Kessler et al., 1976). Damit wird der Nettoeffekt zwischen Sauerstoffangebot und lokalem Sauerstoffverbrauch erfaßt (Lübbers, 1977a, 1977b; Nylander et al., 1983).

9.7.1 Meßprinzip

Das von HYEROVSKI 1922/1924 entwickelte und als Polarographie bezeichnete elektrochemische Analyseverfahren liegt dieser Mehrdrahtoberflächenelektrode zugrunde: Wird zwischen der Meß- (Platin) und Bezugselektrode (Silberchlorid) in der Analysenflüssigkeit (Kaliumchlorid) eine steigende Spannung angelegt, so gelangen Sauerstoffmoleküle an die Meßelektrode und werden bei Erreichen der für Sauerstoff spezifischen Zersetzungsspannung nach folgender Formel reduziert.



Obwohl die Details der einzelnen Schritte nicht vollständig verstanden und aufgeklärt sind, scheint dennoch gesichert, daß 4 Elektronen für ein Sauerstoffmolekül reduziert werden.

Wird dieser fließende Reduktionsstrom bei unterschiedlichen, jedoch konstant gehaltenen, O_2 -Anteilen in einer Lösung gemessen, so erhält man die in der Abbildung wiedergegebene Strom-Spannungskurve (Abbildung 17), die sich durch ein Plateau im Bereich zwischen 700 und 870 mV auszeichnet. In diesem Plateaubereich ist der fließende Strom dem Sauerstoffantransport an der Meßelektrode direkt proportional (Abbildung 18). Damit ist die Grundlage für eine genaue und auch kontinuierliche Messung des örtlichen Sauerstoffpartialdruckes gegeben.

9.7.2. Mehrdrahtoberflächenelektrode (MDO)

Die MDO ist nach dem CLARK-Prinzip (Clark, L.C., US Patent 2.913.386 issued, Nov 17, 1953) aufgebaut, d.h. eine Teflonmembran trennt die in einer Baueinheit zusammengefaßten und in der selben Elektrolytlösung befindlichen Meß- und Bezugselektrode von dem umgebenden Meßmedium (Clark, 1956). Die Besonderheit der von KESSLER und LÜBBERS entwickelten Mehrdrahtoberflächenelektrode liegt darin, daß eine Bezugselektrode mit 8 Meßelektroden in einer Baueinheit kombiniert wurde, um damit die Möglichkeit einer rascheren Meßdatenerfassung zu schaffen (Kessler und Lübbers, 1966; Kessler und Grunewald, 1969) (Abbildung 19). Die 8 Platindrähte mit je 15 μm Durchmesser sind in einem Glaszylinder mit einer 0,25 mm² großen Fläche zufallsverteilt eingeschmolzen. Sie haben einen mittleren Abstand von ca. 500 μm und einen halbkugeligen Einzugsbereich von etwa 30 μm (Kessler et al., 1976, 1986). Die Silber/Silberchlorid-Bezugselektrode ist ringförmig um den Glaszylinder angeordnet.

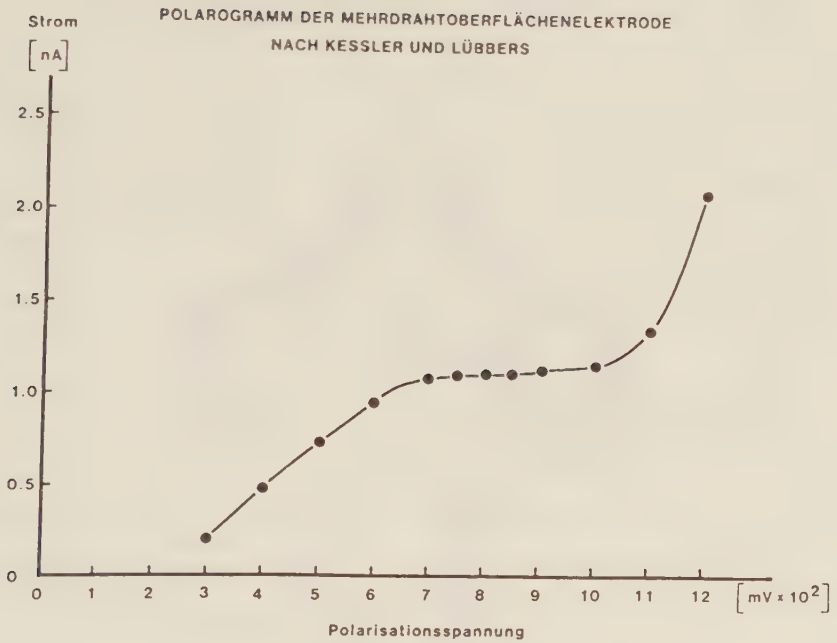


Abbildung 17:

Wiedergegeben ist eine Strom-Spannungskurve bei konstantem pO_2 (nach Kessler et al., 1986).

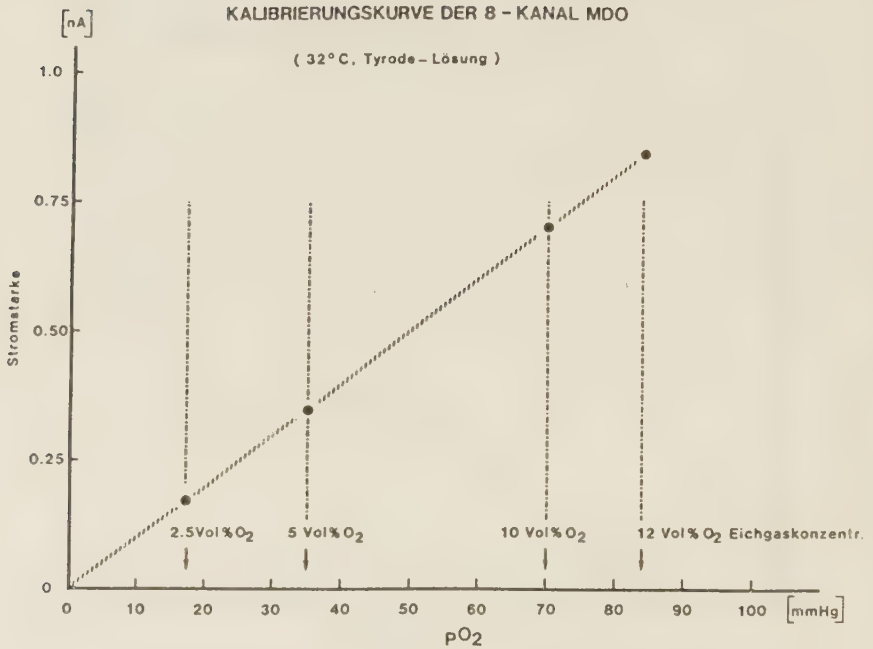


Abbildung 18:

Kalibrierungskurve eines Kanals der Platinmehdrahtelektrode bei einer konstanten Polarisationsspannung (nach Kessler et al., 1986).

MEHRDRAHTOBERFLÄCHENELEKTRODE (nach Kessler und Lubbers)

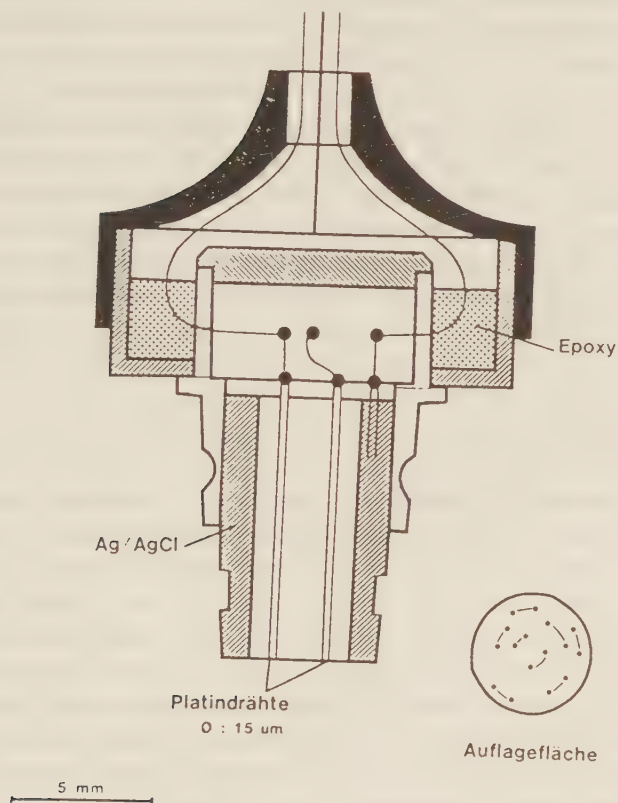


Abbildung 19.:

Graphische Darstellung eines Längsschnittes durch die Mehrdrahtoberflächenelektrode n. KESSLER und LÜBBERS (nach Kessler et al., 1986).

9.7.3. Vorbereitung und Eichung der Mehrdrahtoberflächenelektrode

Die Homogenität der Silberchloridschicht der Bezugselektrode wurde am Tage vor dem Experiment überprüft. Etwa 2 Stunden vor Meßbeginn wurden Ablagerungen von Platinoxid auf den Platindrähten durch Polieren in einer Silbercarbidpulver-Aufschwemmung entfernt. Nach Spülung in destilliertem Wasser wurde ein in 0,2 molarer Kaliumchloridlösung getränktes Cuprophan mit einer Schichtdicke von $12\text{ }\mu\text{m}$ eben über der Meßelektrodenfläche plaziert und mit einem Plexiglasring fixiert. Ein nun auf die Elektrode aufgebrachter 0,2 molarer Kaliumchloridtropfen wurde mittels einer Teflonmembran (Schichtdicke: $10\text{ }\mu\text{m}$) unter Vermeidung von Lufteinschlüssen eingebracht und mit einem Gummiring am Glaszylinder fixiert. Damit wurde eine kontinuierliche Diffusionsstrecke zwischen Organoberfläche und Meßelektrode geschaffen, und zusätzlich die Meßelektroden vor organischen Verunreinigungen geschützt (Kessler, 1973; Kessler et al., 1986).

9.7.4. Eichung

Über mindestens 1 1/2 bis 2 Stunden wurde die Elektrode einem O_2 -haltigen Medium ausgesetzt. Nach eigenen Erfahrungen erreicht man damit einen Bereich mit einer Drift von weniger als 8% pro Stunde nach weiteren 2-3 Stunden eine Drift von weniger als 2% pro Stunde. Unmittelbar vor einer Messung erfolgt eine 2-Punkt-Eichung in einer mit 100% N_2 und einer weiteren mit 95% N_2 / 5% O_2 gesättigten 0,9%igen Natriumchloridlösung, wobei die Eichtemperatur der Temperatur des Gewebes angeglichen sein muß. Dieselbe Eichung wird unmittelbar nach der Erhebung eines sogenannten pO_2 -Histogramms wiederholt. Alternativ wäre auch eine 2-Punkt-Eichung in einer mit 5 und 10 % O_2 -gesättigten Lösung möglich.

9.7.5. Messung in der Hautkammer

Nach den Inauguratoren der Methode werden durch das Eigengewicht der Mehrdrahtoberflächenelektrode keine Veränderungen der Durchblutung im Meßareal, keine Mikroläsionen und insbesondere keine Druckischämie erzeugt. In Vorversuchen, in denen das Gewicht der Elektrode nicht mit Gegengewichten ausbalanciert wurde bzw. durch einen Mikromanipulator das Gewicht der Elektrode reduziert wurde, zeigte sich, daß der Auflagedruck von $1,5 \text{ g}/0,25 \text{ mm}^2$ ausreicht, um eine Verminderung des lokalen Sauerstoffpartialdruckes hervorzurufen. Weiterhin war zu erkennen, daß dadurch insbesondere im Tumorgeewebe mikroskopisch verifizierbare und vereinzelt auftretende Mikroläsionen erzeugt werden können. Während der Versuche wurde deshalb die Elektrode in eine an den Mikromanipulator adaptierte Halterung eingespannt, wodurch sie vorsichtig und mit in Schritten von $0,05 \text{ um}$ auf das Gewebe aufgesetzt werden konnte (Abbildung 20a).

Während der Messung erfolgte eine kontinuierliche Superfusion mit 32°C angewärmter Natriumchloridlösung, sowie bei den letzten Versuchen die Superfusion mit Tyrode Lösung. Beide wurden über eine Paraffinölheizung auf die Ausgangshauttemperatur erwärmt. Die Temperatur am Ausflußschenkel der Paraffinölheizung wurde mit einem Temperaturmeßgerät (Type du3s; Ellab, Kopenhagen, Dänemark) kontrolliert.

9.7.6. Datenaufnahme und -verarbeitung

Die Datenaufnahme erfolgte über die Versuchszeiträume hinweg mit drei verschiedenen Meßeinheiten. Gemeinsam war all diesen Systemen, daß für jeden einzelnen Kanal eine Polarisationsspannung angelegt war und ebenso kanalgetrennt die Reduktionsströme mittels Nanoamperemeter gemessen und über entsprechende Verstärker an einen Analog-Digitalwandler weitergegeben wurden oder direkt auf Meßschreiber mitregistriert wurden. Bei den ersten 10 Versuchstieren, bzw. bei weiteren 8 Versuchstieren wurden die Sondenströme über einen 8-Kanal-Analog-Digitalwandler an einen Computer (PDP 11/03 bzw.

MESSANORDNUNG ZUR MESSUNG DES OBERFLÄCHENGEWEBE pO_2 IN DER HAMSTERHAUTKAMMER

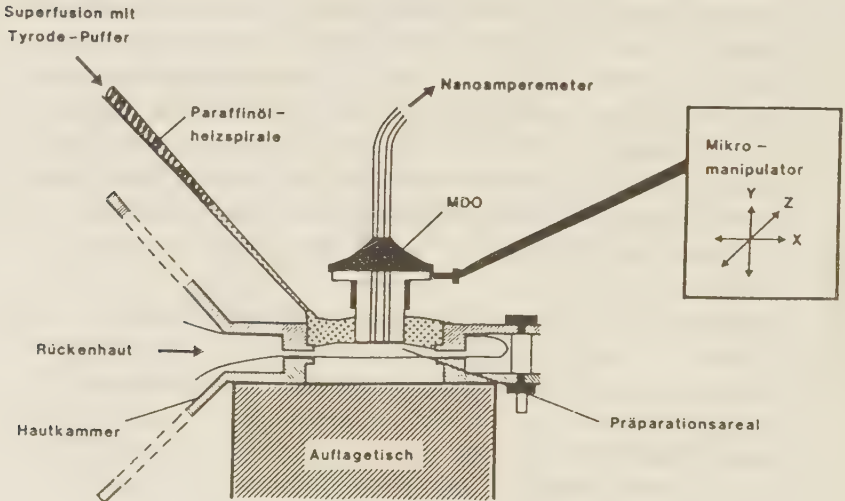


Abbildung 20a:

Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur Bestimmung des Oberflächen- pO_2 in der Hamsterhautkammerpräparation. Während der Messung wird das Präparationsareal mit Tyrode-Puffer, der mittels einer Paraffinöl-Heizspirale erwärmt wird, superfundiert. Die Mehrdrahtoberflächenelektrode wird mit einem Mikromanipulator positioniert.

FLUSSDIAGRAMM DER pO_2 - MESSUNG

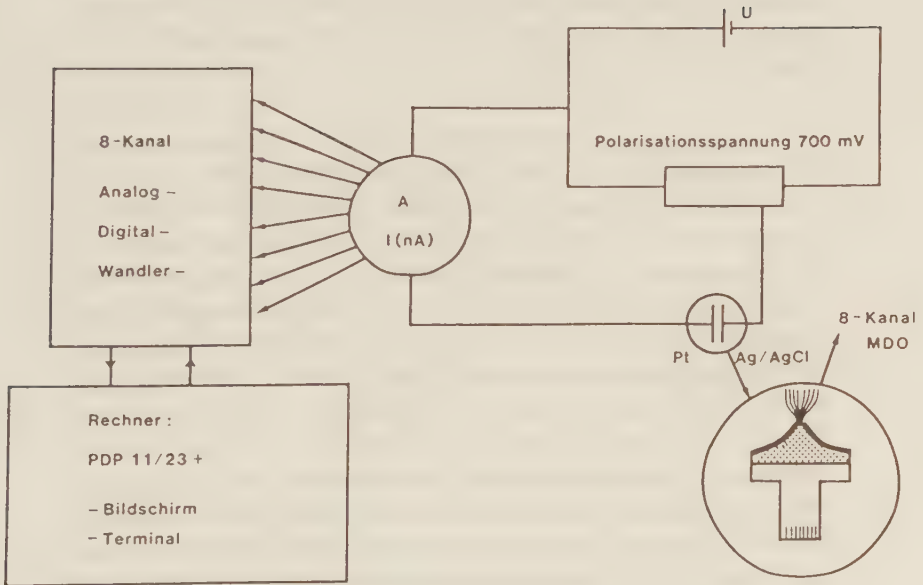


Abbildung 2Ob:

Graphische Darstellung der Meßanordnung zur Bestimmung des Oberflächen- pO_2 mit der Mehrdrahtoberflächenelektrode, sowie des Datenaufnahme- und des Datenverarbeitungssystems.

11/23+; Computer-Programme: "pO₂ - Dortmund", bzw. "pO₂ - Erlangen") weitergegeben und kontinuierlich auf einer Diskette gespeichert, bei gleichzeitiger kontinuierlicher Darstellung auf einem Computerterminal (Abbildung 20b). Die dargestellten Reduktionsströme waren bereits anhand der eingangs erstellten Eichgeraden, des eingegebenen Barometerdruckes und der angegebenen Temperatur korrigiert.

Am Ende einer jeden Messung erfolgte erneut eine 2-Punkt-Eichung. Diese wurde zur Bestimmung der Elektrodrift herangezogen. Erst nach dieser Eichung erfolgte die Ausgabe und Abbildung der driftkorrigierten Meßwerte auf dem Computerterminal. Da für die letzten beiden Versuchstiere die beiden Rechnersysteme nicht zur Verfügung standen, wurden die Werte kontinuierlich auf vier 2-Kanal-Schreibern mitregistriert (Siemens Kompensograph, Siemens, Erlangen). Die Driftkorrektur mußte dann berechnet werden. Diese Messungen wurden mit dem pO₂-Meßplatz des Max-Planck-Instituts für Systemphysiologie in Dortmund durchgeführt.

Grundsätzlich können die Werte in Histogrammform, d.h. in Form einer Häufigkeitsverteilung oder kontinuierlich dargestellt werden. Da es sich bei diesen Versuchen weniger um akute Veränderungen, sondern vielmehr um den Vergleich von Zirkulationssystemen an verschiedenen Tagen bzw. von unterschiedlichen Zirkulationssystemen (Tumorgewebe, tumorumliegendes Gewebe) handelte, wurde die Darstellung in Histogrammform bzw. als kumulative Histogrammform gewählt.

9.7.7. pO₂-Histogramm

Da die Oxygenierung von Geweben nicht durch einen einzelnen Wert gekennzeichnet werden kann, sondern durch Inhomogenität geprägt ist, fordern die Erstbeschreiber der pO₂-Oberflächenelektroden-Messung zur ausreichenden Charakterisierung der lokalen Oxygenierung die Messung von mindestens 80-120 pO₂-Einzelwerten (Lübbbers, 1973, 1977a, 1977b; Kessler et al., 1976,

1981, 1986). Die Einteilung dieser einzelnen pO_2 -Werte erfolgt in Klassen mit einer beliebig wählbaren Klassenbreite. In den dargestellten Histogrammen handelt es sich jeweils um Klassenbreiten von 5 mmHg. Diese Darstellungsform wurde bisher auch allgemein akzeptiert (Leniger-Follert et al., 1975; Schönleben et al., 1978; Lund, 1979; Sunder-Plassmann et al., 1980; Nylander et al., 1983)

9.7.8. Anmerkung zur statistische Verarbeitung von pO_2 -Histogrammen

Es darf an dieser Stelle darauf hingewiesen werden, daß Anfang der 80er Jahre von der Gruppe um LUND und Mitarbeiter eine statistische Verarbeitung der pO_2 -Histogramme vorgeschlagen und publiziert wurde (Lund, 1979; Nylander et al., 1983). Es handelt sich hierbei um einen modifizierten Kolmogorov-Smirnov-Test, der sehr sensitiv statistische Unterschiede in der Histogrammform, d.h. Abweichungen von der Normalverteilung beurteilt (Kolmogorov, 1941; Smirnov, 1948). Streng genommen setzt dieser Test stetige Verteilungen voraus (Sachs, 1984). Dies ist weder bei allen im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Histogrammen, noch in denjenigen der obengenannten Publikationen gegeben. Aus dieser statistischen Verarbeitung können darüberhinaus keine Rückschlüsse auf physiologische Vorgänge im Bereich der Mikrozirkulation gezogen werden, selbst wenn in den obengenannten beiden Publikationen genau das Gegenteil behauptet wird. Nach eingehender Beratung mit den Inauguratoren der Gewebeoberflächen- pO_2 -Messung, Herrn Prof. Lübbers (Max-Planck-Institut für Systemphysiologie, Dortmund) und Herrn Prof. Kessler (II. Physiologisches Institut der Universität Erlangen), wurde deshalb im Rahmen dieser Arbeit davon Abstand genommen, diese pO_2 -Histogramme statistisch in der obengenannten Art und Weise zu bearbeiten. Abschließend darf hierzu bemerkt werden, daß mit diesem Test ein höchst empfindliches statistisches Testverfahren ausgewählt wurde, um überhaupt eine Möglichkeit aufzuzeigen, wie signifikante Unterschiede festgestellt werden können.

Die einzige und bisher auch immer praktizierte Art der statistischen Aufarbeitung ist der Vergleich der Mittelwerte. Darüberhinaus ist das Histogramm

ausreichend durch die Lage, Form, Verteilung, Mittelwert, Spannweite und Steilheit charakterisiert (Luebbers, 1973; Kessler et al., 1973; Luebbers, 1977b).

9.8. Histologie und Elektronenmikroskopie

Die histologischen und elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden freundlicherweise am Anatomischen Institut der Technischen Universität München (Direktor: Prof. Dr. med. F. Hammersen) durchgeführt.

Es wurden drei Kontrolltiere ohne Tumor an den Tagen 3, 7 und 8 nach Kammerimplantation untersucht, sowie je drei Tumortiere 4 bzw. 7 Tage nach Tumorzellimplantation. Zur Durchführung der Elektronenmikroskopie wurden die Hautkammern wie folgt vorbereitet:

Nach intravenöser Pentobarbitalnarkose wurden etwa 8-20 ml einer Natriumcacodylat - und einer 25%igen Glutaraldehydlösung injiziert. Dieses Fixierungsmittel wurde gleichzeitig über die Kammer superfundiert. Es wurde hierzu vorher auf einen pH von 7.35 und eine Osmolarität von 300 mOsm eingestellt.

Nach Fixierung wurde das Kammerareal vorsichtig unter Vermeidung von Berührungen exzidiert, in Fixierungsmittel gelegt und bis zur Elektronenmikroskopie bzw. Histologie bei 4 ° C gelagert. Es wurden Semidünnschnitte (ca. 0,5 µm dick) in Methylenblau-Azur-II-Färbung und elektronenmikroskopische Schnitte gefertigt.

9.9. Erfassung des Antransportes und der Verweildauer fluoreszierender Substanzen durch digitale Bildverarbeitung

An dem Tumormodell des amelanotischen Hamstermelanoms A-Mel-3 und der Hamsterrückenhautkammerpräparation wurde der Antransport und die Verteilung von zwei fluoreszierenden Substanzen mit Hilfe eines digitalen Bildaufnahme- und Verarbeitungssystems untersucht. Die Anreicherung dieser Fluorochrome im Tumor und im tumorumliegenden Gewebe sollten als Modell für den Antransport von Chemotherapeutika dienen und eine Anwendungsmöglichkeit dieses Tiermodells aufzeigen.

Es wurden zwei unterschiedlich fluoreszierende Substanzen verwendet: Hämatoporphyrin-Derivat (HpD), dessen Emissionsspektrum im roten Wellenlängen-Bereich liegt und Na^+ -Fluoreszein (MW 396), das grün fluoresziert. HpD ist eine photosensibilisierende Substanz, die sich selektiv im Tumor anreichert (Kessel, 1984). Aufgrund dieser beiden Eigenschaften wird HpD zur Tumorthherapie verwendet. Darüberhinaus kann es wegen seiner selektiven Anreicherung in Malignomen und seines typischen Fluoreszenzemissionsspektrums auch zur Tumordetektion von kleinen, an Organoberflächen gelegenen Tumorherden, die makroskopisch nicht erkennbar sind, verwendet werden. Bei diesem Detektionsverfahren ist jedoch zu berücksichtigen, daß Hämatoporphyrinderivat oberhalb eines bestimmten Schwellenwertes, der bei etwa $10 \frac{\text{mW}}{\text{cm}^2}$ liegt, "photobleaching", d.h. ein Ausbleichen der Fluoreszenz, zeigt (Kessel, 1984).

Untersuchungen aus der eigenen Arbeitsgruppe unter Verwendung desselben Tumormodells und der zeitaufgelösten Laserfluoreszenzmikroskopie haben gezeigt, daß es zu einer selektiven Anreicherung des HpD im Tumor kommt (Goetz et al., 1985, 1986c). Mit der zeitaufgelösten Laserfluoreszenzmikroskopie war es jedoch nur möglich, die Fluoreszenzintensität über einen weiten Teilbereich des Tumorsystems und des Normalgewebes zu messen. Eine lokale regionale Zuordnung war in den einzelnen Gewebearealen mit diesem Meßsystem nicht möglich.

Es war daher das Ziel, mit Hilfe eines digitalen Bildaufnahme- oder Verar-

beutungssystems die Kinetik des Antransportes und der Verweildauer dieses Fluorochroms im Tumor- und im Normalgewebe zu untersuchen. Hierbei sollte eine lokale Zuordnung innerhalb der Gewebeareale möglich sein. Weiterhin mußte es möglich sein, die Leistungsintensität des bestrahlten Lichtes so gering zu halten, daß kein "photobleaching" erzeugt wird.

In einem weiteren Versuchsansatz wurde die Anreicherung von Na^+ -Fluoreszein untersucht. Die Kinetik dieser Substanz im Tumor war unbekannt.

Methodisches Vorgehen:

Es wurden 5 Syrische Goldhamster mit Tumoren der Tage 6 und 7 verwendet. Diesen Tieren wurde HpD in einer Dosierung von 5 mg/kg Körpergewicht (Photofrin II, Photomedica Inc., New York) intravenös verabreicht. Die Fluoreszenzanreicherung wurde über 6 Stunden lang verfolgt. 24 Stunden später wurde erneut die Fluoreszenz im gesamten Kammerareal aufgenommen. Nach dem 24-Stunden-Wert wurden denselben Tieren 0,1 ml einer 1%igen Na^+ -Fluoreszeinlösung i.v. appliziert. Die Anreicherung der Fluoreszenz wurde über 1 Stunde hinweg verfolgt.

Zur Darstellung der Rotfluoreszenz des HpD bzw. der Grünfluoreszenz des Fluoreszeins wurden der D- bzw. I_2 -Filterblock (Fa. Leitz GmbH, Wetzlar) verwendet. Im D-Filterblock war über dem Sperrfilter zusätzlich ein Kantenfilter bei 605 nm angebracht. Als Anregungslichtquelle wurde eine Quecksilberdampfampe (HBO-50 W, Leitz GmbH, Wetzlar) verwendet. Die emittierte Rotfluoreszenz und Grünfluoreszenz wurde mit Hilfe einer Videokamera (C100, Fa. Hamamatsu Photonics, Herrsching) aufgenommen und in einem nachgeschalteten Bildverarbeitungssystem digitalisiert und gespeichert. Wie in Abbildung 21 dargestellt besteht dieser Bildprozessor aus einem A/D-Wandler (8 bit) und 3 Bildspeichereinheiten (je 512 x 16 bit). Mit Hilfe dieser 3 Bildspeicher konnten die digitalisierten Bildern, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Injektion der beiden Fluorochrome aufgenommen worden waren, voneinander subtrahiert werden. Die Zunahme bzw. die Abnahme der Fluoreszenz in jeder beliebigen Region des Kammerareales konnte damit dargestellt und quantifiziert werden.

An dieser Stelle soll auch auf methodische Voraussetzungen eingegangen wer-

VIDEOFLUORESCENZMIKROSKOPIE MIT BILDERARBEITUNG

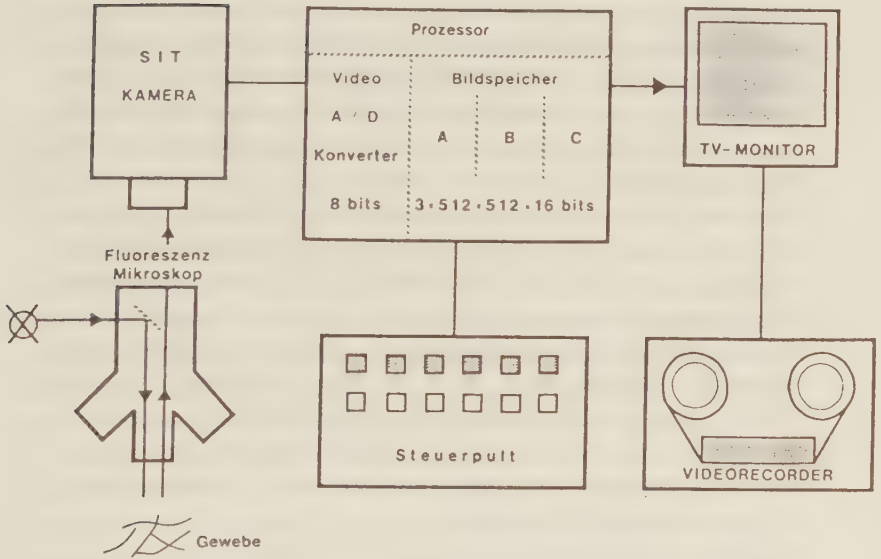


Abbildung 21:

Schematische Darstellung des Bildaufnahme- und Bildverarbeitungssystems zur quantitativen intravitalmikroskopischen Erfassung des Antransportes und des Speicherungsverhaltens von systemisch applizierten Fluorochromen.

den, die es ermöglichten, digitalisierte Bilder quantitativ zu analysieren. Erste Voraussetzung für eine quantitative Analyse von digitalisierten Bildern war eine homogene Fluoreszenzanregung im Beobachtungsfeld. Dies bedeutete, daß die Fluoreszenzintensität des einstrahlenden Lichtes der Quecksilberhochdrucklampe sich homogen auf das Beobachtungsfeld verteilen mußte. Dies wurde mit einem Powermeter kontrolliert, wobei Abweichungen um 10 % in Kauf genommen werden mußten (Powermeter, Coherent Radiation Laboratories, Model 212; Fa. Polytec Grünwettersbach). Es wurde hierbei beobachtet, daß die Quecksilberhochdrucklampe spontane Schwankungen in ihrer Beleuchtungsintensität von bis zu 5 % aufwies.

Die Homogenität der Beleuchtung im Meßareal wurde überprüft, indem fluoreszierendes Papier beleuchtet wurde und über dieses Papier, d.h. zwischen Beleuchtungsquelle und Papier, Streuscheiben gelegt wurden. Anschließend wurden fluoreszenzmikroskopische Bilder aufgenommen und die Bilder im Bildspeicher akkumuliert, d.h. digitalisiert. Die digitalisierten Bilder wurden auf Homogenität über den gesamten Bereich geprüft. Die Auswertung erfolgte durch Einblendung von horizontalen oder vertikalen Meßlinien in den Monitor. Für jedes Pixel wurden die Grauwerte quantitativ ausgewertet und im Monitor als Zahlenwerte dargestellt. Eine horizontale Linie kennzeichnete die Homogenität der Beleuchtung.

Zusätzlich wurden die digitalisierten Bilder ausgewertet, indem die Grauwerte bestimmter rechteckiger oder quadratischer Areale quantifiziert wurden. Das rechteckige Areal wurde hier beliebig im Monitor bewegt und die errechneten Werte miteinander verglichen. Mit dem Versuch wurde erst begonnen, wenn die Abweichungen innerhalb der Monitorfläche weniger als 10 % betrugen.

Weiterhin mußte eine Linearität des Detektionssystems gewährleistet sein. Um quantitative Aussagen über eine Fluoreszenzanreicherung treffen zu können, mußte diese Linearität in jedem Falle gewährleistet sein. Die Linearität wurde durch Einlegen unterschiedlicher Graufilter in den Beleuchtungsweg, sowie durch die Verwendung eines Graukeiles geprüft. Nach dieser Vorbereitung des Bildaufnahme- und Subtraktionssystems und der Einjustierung der Beleuchtung konnte mit dem Versuch begonnen werden.

10. Darstellung der Meßergebnisse und statistische Verarbeitung

Die Daten werden in Boxplots (McNeil, 1977; Tuckey, 1977), d.h. als sog. Kastenzeichnung dargestellt (siehe Abbildung 24ff). Der mittlere Querstrich kennzeichnet den Median. Oberhalb und unterhalb dieses Meßwertes liegen jeweils 50 % aller Einzelmessungen. Um den Median wird als Box das obere und untere Quartil eingezeichnet. Damit sind innerhalb dieses Interquartil-Abstandes 50 % der Meßwerte enthalten. Jeweils 25 % der Meßwerte liegen oberhalb und unterhalb dieses Kastens und sind durch vertikale Striche gekennzeichnet. Sie wurden jeweils bis zum äußersten, d.h. dem größten und kleinsten Meßwert verlängert.

Im Gegensatz zur klassischen Darstellungsweise von Mittelwert und Standardabweichung hat dieses Verfahren den Vorteil, daß auf einen Blick das Ausmaß der Streuung und die Schiefe der Verteilung abgelesen werden können. D.h. ist der Median in der Mitte der "Box" lokalisiert, so ist die Verteilung im Zentrum symmetrisch, ist er jedoch in Nähe der Interquartillnien lokalisiert, so ist die Verteilung schief.

Mittelwerte + Standardabweichung der einzelnen Parameter wurden berechnet und sind in den Tabellen 1 - 19 wiedergegeben.

Der statistische Vergleich der Ergebnisse zwischen den einzelnen Gruppen (Normalgewebe, Tumorgewebe, tumorumliegendes Gewebe) erfolgte mit dem Wilcoxon-Mann-Whitney-U-Test (Sachs, 1984). Der Vergleich der einzelnen Parameter über den Meßzeitraum von 12 Tagen innerhalb einer Gruppe erfolgte mit dem Friedman-Test (Sachs, 1984). Dieser Vergleich konnte jedoch nur dann durchgeführt werden, wenn identische Gefäßsegmente miteinander verglichen werden konnten. Beim Vergleich in Gruppe II (Tumorgewebe) wurde dann der Wilcoxon-Mann-Whitney-U-Test angewendet, wenn der Vergleich identischer Gefäßsegmente nicht möglich war, z.B. beim Vergleich der Kapillaren im Tumorgewebe und dem Gewebeareal vor Tumorzellimplantation, sowie beim Vergleich der Kapillaren im Verlauf des Tumorstadiums.

Die Signifikanzniveaus sind durch ein ($p < 0,05$) oder zwei Symbole ($p < 0,01$) gekennzeichnet.

III. ERGEBNISSE

1.1. Makrohämodynamische Veränderungen

In den Tabellen 1 und 2 ist das Verhalten des arteriellen Mitteldruckes, des zentralvenösen Druckes und der Herzfrequenz in den Tieren mit bzw. ohne Tumor wiedergegeben. In allen 3 Meßgrößen zeigten sich im Verlauf des Beobachtungszeitraumes von 12 Tagen weder innerhalb der beiden Gruppen noch zwischen beiden Gruppen statistisch signifikante Unterschiede. Die erhaltenen Ergebnisse stimmen mit den Angaben in der Literatur gut überein (Stroia et al., 1954, Berman et al., 1955a, 1955b, 1956).

1.2. Verhalten der Blutgase und des pH-Wertes

In Tabelle 3 und 4 sind die Werte der Blutgase und des pH-Wertes der beiden Versuchsgruppen über den Meßzeitraum von 12 Tagen dargestellt. Es zeigten sich über den Versuchszeitraum hinweg weder statistisch signifikante Unterschiede innerhalb der einzelnen Gruppen, noch zwischen den beiden Gruppen der tumortragenden und der nichttumortragenden Tiere. Die Meßergebnisse stehen im Einklang mit den bisherigen Literaturangaben (Ulrich et al., 1963, Volkert et al., 1970, Pereira et al., 1977, O'Brien et al., 1979).

1.3. Mikroskopische und makroskopische Befunde

1.3.1. Versuchstiere ohne Tumor (Gruppe I)

In dem Abschnitt Methodik wurden die Gefäßversorgung und die Angioarchitektur der Hamsterhautkammerpräparation, sowie die Definition und die Auswahlkriterien der Mikrozirkulationspräparation bereits ausführlich beschrieben. Im Verlauf der Messungen über 12 Tage hinweg und während der Be-

Tabelle 1

Arterieller Mitteldruck (MAP), zentralvenöser Druck (ZVD) und Herzfrequenz (HF) in der Gruppe der nicht-tumortragenden Tiere an den Tagen 0, 4, 8 und 12. Die Werte sind als Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung wiedergegeben. Unter dem Meßwert ist jeweils die Anzahl der Messungen angegeben. n = Anzahl der gemessenen Tiere

Tag	0	4	8	12
MAP (mmHg)	101 $\pm$ 13 (20)	109 $\pm$ 11 (17)	111 $\pm$ 7 (14)	112 $\pm$ 14 (11)
ZVD (mmHg)	-0,5 $\pm$ 2,1 (18)	1,5 $\pm$ 1,7 (15)	2,3 $\pm$ 1,3 (14)	1,6 $\pm$ 2,5 (13)
HF (s ⁻¹)	347 $\pm$ 41 (19)	339 $\pm$ 34 (17)	363 $\pm$ 42 (16)	379 $\pm$ 45 (15)
n	20	20	20	18

Tabelle 2

Arterieller Mitteldruck (MAP), zentralvenöser Druck (ZVD) und Herzfrequenz (HF) in der Gruppe der tumortragenden Tiere (amelanotisches Hamstermelanom A-MEL-3) an den Tagen 0, 4, 8 und 12. Die Werte sind als Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung wiedergegeben. Unter dem Meßwert ist jeweils die Anzahl der Messungen angegeben. n = Anzahl der gemessenen Tiere

Tag	0	4	8	12
MAP (mmHg)	105 $\pm$ 12 (19)	103 $\pm$ 13 (16)	109 $\pm$ 8 (13)	112 $\pm$ 11 (12)
ZVD (mmHg)	-1,1 $\pm$ 2,5 (20)	1,2 $\pm$ 1,6 (17)	1,9 $\pm$ 1,4 (14)	2,1 $\pm$ 1,9 (12)
HF (s ⁻¹)	367 $\pm$ 37 (19)	341 $\pm$ 43 (19)	371 $\pm$ 32 (16)	358 $\pm$ 34 (13)
n	20	20	17	15

Tabelle 3

Arterielle Blutgase ($p_a O_2$, $p_a CO_2$) und pH-Wert in der Gruppe der nicht-tumortragenden Tiere an den Tagen 0, 4, 8 und 12. Die Werte sind als Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung wiedergegeben. n = Anzahl der gemessenen Tiere

Tag	0	4	8	12
$p_a O_2$ (mmHg)	83,4 $\pm$ 7,4	82 $\pm$ 6,1	79 $\pm$ 8,1	82 $\pm$ 6,4
$p_a CO_2$ (mmHg)	41,2 $\pm$ 3,2	42,1 $\pm$ 4,1	39,7 $\pm$ 3,1	39,1 $\pm$ 4,1
pH	7,37 $\pm$ 0,03	7,38 $\pm$ 0,04	7,39 $\pm$ 0,03	7,36 $\pm$ 0,03
n	18	15	12	9

Tabelle 4

Arterielle Blutgase ($p_a O_2$, $p_a CO_2$) und pH-Wert in der Gruppe der tumortragenden Tiere (Ä-MEL-3) an den Tagen 0, 4, 8 und 12. Die Werte sind als Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung wiedergegeben. n = Anzahl der gemessenen Tiere

Tag	0	4	8	12
$p_a O_2$ (mmHg)	79,1 $\pm$ 7,8	83,4 $\pm$ 5,9	84,1 $\pm$ 4,1	81,2 $\pm$ 5,4
$p_a CO_2$ (mmHg)	38,7 $\pm$ 2,9	39 $\pm$ 3,2	40,7 $\pm$ 4,2	41,2 $\pm$ 4,5
pH	7,39 $\pm$ 0,04	7,36 $\pm$ 0,03	7,35 $\pm$ 0,02	7,38 $\pm$ 0,04
n	17	13	11	10

obachtungsphasen wurde insbesondere darauf geachtet, daß die einzelnen Präparationen, in die keine Tumorzellen implantiert worden waren, den Kriterien einer intakten Mikrozirkulationspräparation auch über den gesamten 12-tägigen Versuchsverlauf hinweg genügten. Diesbezüglich darf auf Abschnitt 5 der Methodik hingewiesen werden.

Wesentliches Merkmal dieser intakten Präparationen war, daß am Tag 0, d.h. am 2. postoperativen Tag im Vergleich zur ersten photomakroskopischen Aufnahme und der mikroskopischen Inspektion unmittelbar nach der Operation der Tiere keine Neovaskularisation vorzufinden war. Das Durchmesser Verhältnis der Transversalarteriolen und der parallel dazu verlaufenden Sammelvenolen lag bei etwa 1:3 bis 1:4. Dies war meist bereits makroskopisch erkennbar und wurde nur während der ersten 8 Versuche auch quantifiziert. Anhand der makroskopischen Aufnahmen konnten auch Blutungen, petechiale Hämorrhagien, Abflußstauungen, Ödembildungen und Permeabilitätssteigerungen identifiziert werden. Anhaften von weißen Blutzellen am postkapillären bzw. venulären Endothelwall wurde durch Intravitalmikroskopie verifiziert. Falls sich diese Änderungen im Verlauf des Meßzeitraumes ergaben, wurden die Tiere von der Studie ausgeschlossen. Derartige und weitere pathophysiologisch bedeutsame Veränderungen, wie sie in Abschnitt 5 der Methodik dargestellt sind, waren in den Tieren, in denen die quantitativen mikrozirkulatorischen Messungen durchgeführt wurden, nicht zu beobachten.

1.3.2.1. Tumortragende Tiere

1.3.2.1.1. Tumorentstehung und Tumorgewebe (Gruppe II)

Die makroskopisch, bzw. mikroskopisch faßbare zeitliche Abfolge der Tumorbildung und des Tumorwachstums stellte sich wie folgt dar.

Nachdem am Tag 0 die Tumorzellen implantiert worden waren, war am darauffolgenden Tag eine Hyperämie im Bereich der Kapillaren, Postkapillaren und Venolen vorzufinden. Die Durchblutungszunahme konnte anhand quantitativer intravitalmikroskopischer Vergleichsmessungen identischer Gefäßsegmente bewiesen werden. Darüberhinaus war eine Erweiterung der Gefäßdurchmesser von

Kapillaren, Postkapillaren und Venolen bereits photomakroskopisch deutlich zu erkennen. Anhand der mikroskopischen Aufnahmen konnten nach Injektion von FITC-Dextran 150 Ablagerungen dieser Fluorochrome am Gefäßwall im Bereich neu entstandener, kleiner Aussackungen festgestellt werden.

Diese aneurysmatischen Aussackungen waren Anzeichen für eine beginnende Gefäßneubildung, eine sog. Neoangiogenese, ausgehend vom Gefäßwall der ortsständigen Mikrogefäße. Am darauffolgenden Tag waren neben weiteren neuen Aussackungen bereits deutliche Gefäßsprossungen mit einer Länge von bis zu 30 µm erkennbar, in denen sich neben dem FITC-Dextran als Plasmamarker auch einzelne Erythrozyten als Negativ-Kontrast abhoben. Am darauffolgenden Tag, dem 3. Tag nach Tumorzellimplantation, waren die Gefäßsprosse zum Teil um mehr als das Doppelte verlängert und waren häufig bereits eine Verbindung untereinander eingegangen. Damit hatte sich ein neues Gefäßsystem entwickelt, das von den ortsständigen kapillären, postkapillären und venulären Gefäßen versorgt wurde. Nur in ganz wenigen Ausnahmen ($n = 3$) konnte auch ein direkter Anschluß dieses neugebildeten Gefäßsystems an präkapilläre Gefäße festgestellt werden. Das neugebildete Tumorgefäßsystem zeigte im Gegensatz zur organisierten parallelen Anordnung der Muskelkapillaren eine chaotische Angioarchitektur (Abbildung 23). Zu diesem Zeitpunkt zeigten die Tumorgefäße Gefäßdurchmessersprünge und aneurysmatische Ausbuchtungen. Nahezu alle Kapillaren schienen perfundiert. Manchmal war eine kurzzeitige Stase oder sogar eine Umkehr der Fließrichtung in den Tumorgefäßen zu beobachten. An den nächsten Tagen folgte eine überschießende Kapillarneubildung. Zu diesem Zeitpunkt unterschieden sich die zentral gelegenen Tumorgefäße weder in ihrer Anordnung noch in ihrem Gefäßdurchmesser wesentlich von den Gefäßen, die am Rand zum Normalgewebe hin lagen.

Etwa ab Tag 6 zeigten sich makroskopisch erkennbare Unterschiede zwischen den zentral gelegenen Gefäßen und den randständigen Tumorgefäßen. Die Durchmesser in den zentral gelegenen Gefäßen waren geringer als die der Tumorrandgefäße. Die Tumorrandgefäße übernahmen, wie der Fließrichtung des Blutstroms zu entnehmen war, hauptsächlich Drainagefunktion für den Tumor. Die Randgefäße waren häufig parallel angeordnet, während die zentral gelegenen Gefäße weiterhin eine chaotische Angioarchitektur aufwiesen.

Mikroskopisch erkennbar war, daß ab Tag 2 nahezu alle Tumorgefäße durchblutet waren. Etwa ab Tag 6 bis 7 zeigte sich in den Tumorkapillaren im Tumorzentrum z.T. eine Stase, während nahezu alle Gefäße im Tumorrandbereich perfundiert waren. Diese Unterschiede zwischen Tumorzentrum und Tumorrand verstärkten sich kontinuierlich bis zum Ende des Beobachtungszeitraums von 12 Tagen.

Generell waren auf mikroskopischer und makroskopischer Ebene in den Tumorgefäßen erhebliche Durchmessersprünge innerhalb einer Gefäßstrecke von wenigen um zu beobachten, d.h. die Tumorgefäße zeigten Gefäßwandaussackungen, die als Mikroaneurysmen interpretiert wurden.

An der luminalen Seite der Gefäßwand der Tumorkapillaren waren im Intravitalmikroskop unter Durchlichtbeleuchtung häufig amorphe Konglomerate zu sehen. Diese sich weiß darstellenden Strukturen waren manchmal in der Lage das Gefäß völlig zu verschließen, meist jedoch engten sie das Gefäßlumen nur zum Teil ein. Mit Hilfe von Acridinorange, einem Fluorochrom, das nach intravasaler Applikation Thrombozyten markiert (Tangelder et al., 1982), konnte bewiesen werden, daß diese amorphen Strukturen im wesentlichen aus Thrombozytenaggregaten bestehen.

Intravitalmikroskopisch war deutlich zu erkennen, daß die Fließgeschwindigkeit und die Fließrichtung in den Tumorgefäßen sich innerhalb weniger Sekunden völlig ändern konnte, z.T. wurde eine Flußumkehr beobachtet. Dies war häufig durch das Auftreten der amorphen Konglomerate im Gefäßlumen bedingt.

Am Tumorrand trat frühzeitig ein Ödem auf, das einen Saum von etwa 0,5 - 1 mm zum umliegenden Wirtsgewebe hin bildete. Dieses Tumorrandödem zeigte sich in allen Präparationen.

1.3.2.2. Tumorumliegendes Gewebe (Gruppe III)

Die Mikrozirkulation des tumorumliegenden Gewebes zeigte, wie makroskopisch und mikroskopisch zu beobachten war, zunächst keine besonderen Veränderungen und war weitgehend mit dem Verhalten der Hautmuskelmikrozirkulation in den Normalgewebspräparationen vergleichbar (siehe 1.3.1.). Da sich im Ver-

lauf des Tumorwachstums das Tumorgewebe an das tumorumliegende Gewebe annäherte, waren an den Tagen 8 bis 12 häufig bereits makroskopisch erkennbare Veränderungen in diesem Gefäßbereich zu verzeichnen.

Sobald das tumorumliegende Gewebe in den Einzugsbereich der Ödemzone des Tumors gelangte, konnte eine Erweiterung der kapillären, postkapillären und venulären Gefäße beobachtet werden. Es zeigte sich dann auch eine Hyperämie in diesem Bereich. Dies schien mit einer Blutflußsteigerung verknüpft. Die Gefäße waren zu diesem Zeitpunkt im makroskopischen Bild nicht mehr deutlich abzugrenzen. Reichte das tumorumliegende Gewebe direkt an das Tumorgefäßsystem heran, war ebenfalls eine Gefäßneubildung, wie sie im vorhergehenden Abschnitt (siehe 1.3.2.1.) beschrieben wurde, zu beobachten. Das neugebildete Gefäßsystem wurde in den Tumor inkorporiert. Bisweilen war dies mit einer Flußumkehr in den einzelnen Gefäßen verbunden, d.h. war beispielsweise bis zum Tag 8 eine Fließrichtung vom Tumor weg zu beobachten, so zeigte sich, sobald das Tumorrandödem das Beobachtungsareal erreicht hatte, eine Fließrichtung zum Tumorgefäßgebiet hin. Sobald das tumorumliegende Wirtsgefäßsystem in den Bereich der Ödemzone des Tumors inkorporiert wurde, übernahm dieses Gefäßsystem im tumorumliegenden Gewebe bereits eine Versorgungsfunktion für den Tumor.

1.4. Tumorwachstum

Das Tumorwachstum wurde anhand der photomakroskopischen Aufnahmen (Abbildung 22) dokumentiert. Anhand der Durchmesserbestimmung konnte die Tumorwachstumskurve, die in Abbildung 24 dargestellt ist, ermittelt werden. Im Zeitintervall der Kapillarneubildung, d.h. bis etwa zum Tag 3 - 4 fand nahezu kein Tumorwachstum statt. An den darauffolgenden Tagen zeigte sich eine nahezu exponentielle Steigerung des Tumorwachstums, das ab Tag 9 von einer geringeren Zunahme gefolgt war.

Versuche das Tumolvolumen anhand einer Volumenverdrängungsmethode, bzw. mit Hilfe von Mikromethoden anhand der Abhebung der Haut vom Fensterareal auf der gegenüberliegenden Seite festzuhalten, schlugen fehl. Ein exaktes Tu-

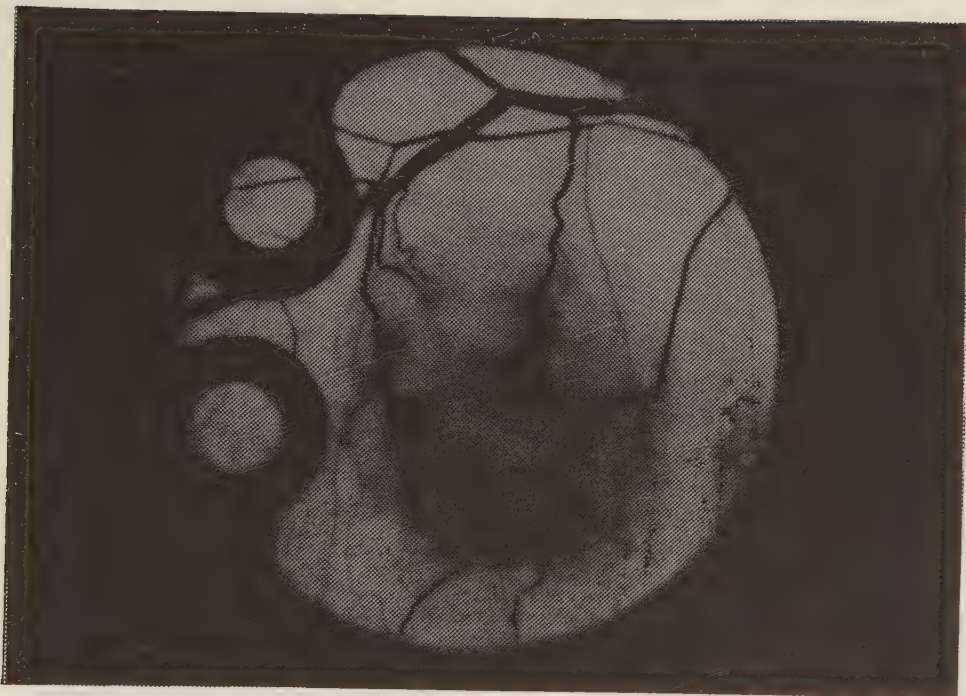


Abbildung 22:

Ein amelanotisches Hamstermelanom A-Mel-3 am Tag 5 nach Implantation der Tumorzellen in das Zentrum des Präparationsareals. Derartige photomakroskopische Aufnahmen wurden zur Bestimmung des Tumorradius herangezogen.

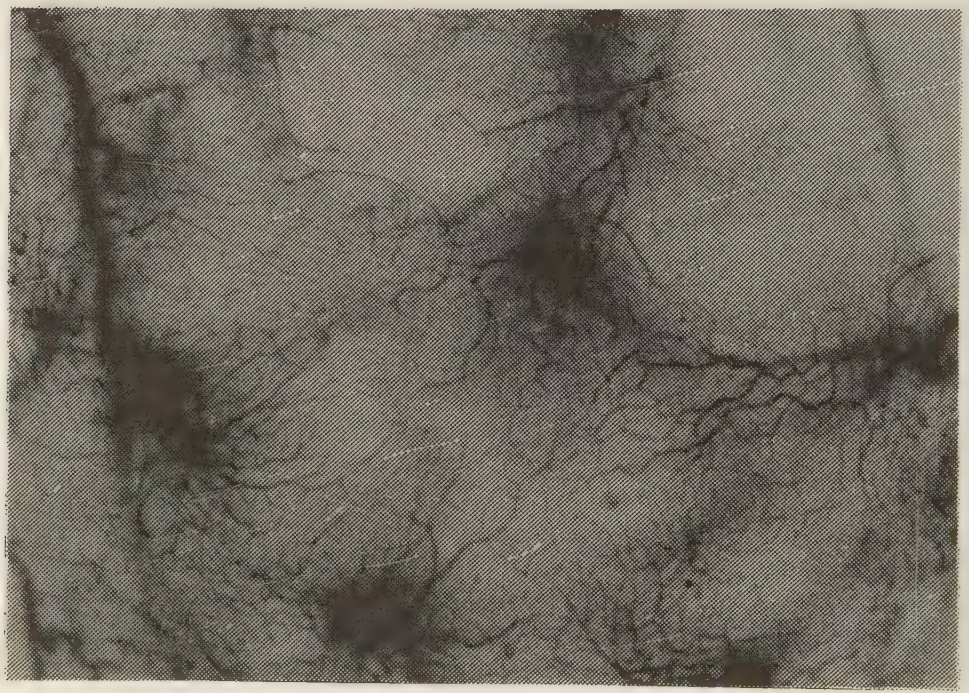


Abbildung 23:

Photomakroskopische Aufnahme eines amelanotischen Hamstermelanoms A-Mel-3 6 Tage nach Tumorzellimplantation. Deutlich ist die chaotische Gefäßarchitektur im Tumor zu erkennen.

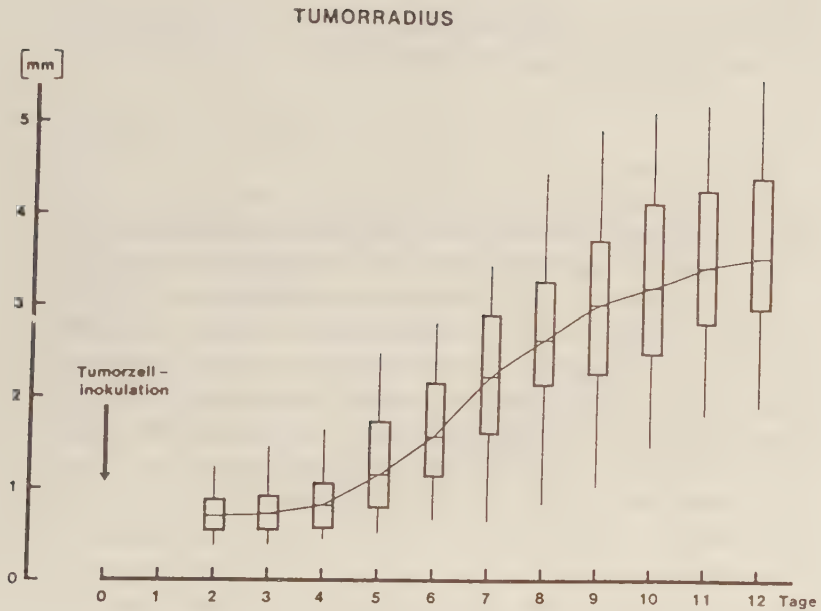


Abbildung 24:

Wiedergegeben ist eine Tumorstadiumskurve aus einer Gesamtpopulation von 31 Tieren. Dargestellt sind die Tumorradii, die anhand photomakroskopischer Aufnahmen ermittelt wurden. Die Meßwerte der einzelnen Tage sind in Boxplots dargestellt.

morvolumenwachstum kann daher ebenso wenig wie eine Tumorgewichtszunahme für die einzelnen Meßtage angegeben werden.

2. Mikrohämodynamische Veränderungen

Die mikrohämodynamischen Messungen werden im folgenden getrennt für die einzelnen Gefäßsegmente, sowie separat für die Mikrozirkulation des Hautmuskels, des Tumorgewebes, des tumorumliegenden Gewebes und des Gewebeareals, in das die Tumorzellen implantiert worden waren, zusammengefaßt. Die einzelnen Meßergebnisse für Transversalarteriolen, terminale Arteriolen, Präkapillaren, Postkapillaren, Venolen und Sammelvenolen sind jeweils in Boxplots (siehe 10. der Methodik) dargestellt. Die jeweiligen Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung, sowie die Signifikanzniveaus sind in den Tabellen 5 - 11 aufgelistet.

2.1.1. Transversalarteriolen

In Abbildung 25 und Tabelle 5 sind die Veränderungen von Gefäßdurchmesser, Blutzellgeschwindigkeit und Volumenfluß in den Transversalarteriolen der verschiedenen Gewebeareale wiedergegeben. Im 12-tägigen Meßzeitraum wurden im Hautmuskel keine Veränderungen und im tumorumliegenden Gewebe eine statistisch signifikante Zunahme der Gefäßdurchmesser am Tag 12 gemessen. Die Gefäßdurchmesser und der Volumenfluß nahmen im Bereich der tumorversorgenden Transversalarteriolen am Tag 4 signifikant im Vergleich zum Ausgangswert zu, und waren an den Tagen 8 und 12 hochsignifikant erhöht. Der weitere Vergleich der Messungen im Verlauf des Tumorwachstums, d.h. Tag 8 und 12 gegen Tag 4, zeigte weitere signifikante Anstiege dieser beiden Parameter. Damit einher ging eine signifikante Zunahme der Blutzellgeschwindigkeit am Tag 12 im Vergleich zum Ausgangswert.

Der Vergleich der einzelnen Gewebeareale zeigte signifikant bzw. hochsignifikant erhöhte Gefäßdurchmesser und Volumenflüsse im Tumor an den Tagen 4, 8 und 12. Die Blutzellgeschwindigkeit blieb im Mittel unverändert.

2.1.2. Terminale Arteriolen

In Tabelle 6 und Abbildung 26 sind die mikrohämodynamischen Veränderungen der Gefäßdurchmesser, Blutzellgeschwindigkeiten und Volumenflüsse in den terminalen Arteriolen wiedergegeben. Die erhaltenen Ergebnisse glichen denen der Transversalarteriolen.

Die tumorversorgenden terminalen Arteriolen waren an den Tagen 4, 8 und 12 signifikant, bzw. hochsignifikant dilatiert. Dies ging mit einer signifikanten Zunahme des Volumenflusses an den Tagen 4 und 8 einher. Zusätzlich waren die Gefäßdurchmesser am Tag 12 signifikant gegenüber Tag 4 und Tag 8 erhöht. In den anderen Gewebearealen blieben nahezu alle Meßwerte unverändert. Beim Vergleich des Tumor- und tumorumliegenden Gewebes mit dem Hautmuskel zeigte sich wiederum eine statistisch gesicherte Zunahme der Gefäßdurchmesser und des Volumenflusses in den tumorversorgenden terminalen Arteriolen an den Tagen 4, 8 und 12, sowie eine signifikante Steigerung der Blutzellgeschwindigkeit im tumorumliegenden Gewebe am Tag 12. Im Vergleich zur Kontrollgruppe war der Volumenfluß im tumorumliegenden Areal an den Tagen 8 und 12 signifikant erhöht.

2.1.3. Präkapillaren

Die in Abbildung 27 und Tabelle 7 wiedergegebenen Veränderungen von Gefäßdurchmesser, Blutzellgeschwindigkeit und Volumenfluß in Präkapillaren zeigten im wesentlichen die bisher dargestellten Ergebnisse der arteriellen Mikrogefäße.

Im Meßzeitraum waren im Hautmuskel keine statistisch faßbaren Veränderungen festzustellen. Demgegenüber waren die tumorversorgenden Präkapillaren am Tag 4 signifikant und am Tag 8 und 12 hochsignifikant dilatiert. Der Vergleich von Tag 12 und Tag 4 zeigte eine nochmalige signifikante Zunahme des Gefäßdurchmessers in diesen Präkapillaren. Die identischen signifikanten,

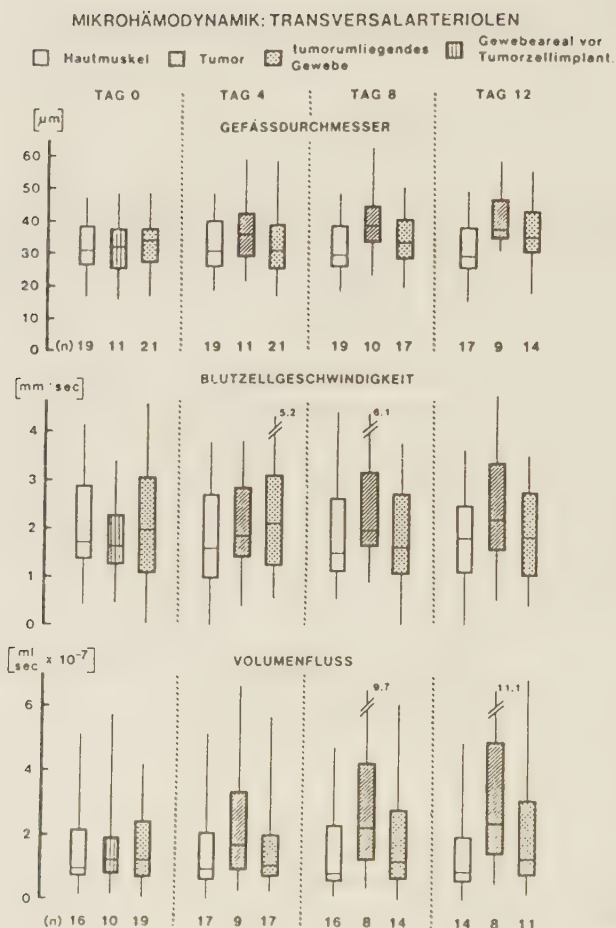


Abbildung 25:

Gefäßdurchmesser, Blutzellgeschwindigkeit und Volumenfluß der Transversalarteriolen des Hautmuskels, des Tumorgewebes und des tumorumliegenden Gewebes an den Tagen 0, 4, 8 und 12, sowie des Gewebeareals vor Tumorzellimplantation am Tag 0. Die Meßwerte sind in Boxplots dargestellt. Die Zahlen unter den Boxplots (n) geben die Anzahl der Meßpunkte wieder, wobei die des Volumenflusses auch für die Blutzellgeschwindigkeit gelten.

Tabelle 5

Gefäßdurchmesser (d in μm), Blutzellgeschwindigkeit (v in mm/sec) und Volumenfluß (Q in $\text{ml} \times 10^{-7} \times \text{sec}^{-1}$) der Transversalarteriolen des Hautmuskels (I), des Tumorgewebes (II) und des tumorumliegenden Gewebes (III) an den Tagen 0, 4, 8 und 12 sowie des Gewebeareals vor Tumorzellimplantation am Tag 0 (II, Tag 0). Es sind Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung angegeben, sowie in Klammern die Anzahl der Meßpunkte. Statistisch signifikante Unterschiede sind durch folgende Symbole gekennzeichnet: *: Gruppe II, III vs I; + : Tag 4/8/12 vs 0; ° : Tag 8/12 vs 4; #: Tag 8 vs 12. Signifikanzniveaus: 1 Symbol $p < 0,05$, 2 Symbole $p < 0,01$.

Tag	0	4	8	12
d: I	28,6 $\pm$ 6,1 (19)	29,3 $\pm$ 4,3 (19)	27,4 $\pm$ 4,9 (19)	31,1 $\pm$ 7,8 (17)
II	30,1 $\pm$ 6,7 (11)	35,1 $\pm$ 7,2 ^(*+) (11)	41,2 $\pm$ 8,2 ^(**++°) (10)	43 $\pm$ 5,7 ^(**++°) (9)
III	33,2 $\pm$ 5,1 (21)	32,4 $\pm$ 8,0 (21)	34,0 $\pm$ 5,3 (17)	36 $\pm$ 8,1 (14)
v: I	1,8 $\pm$ 0,8 (16)	1,5 $\pm$ 0,6 (17)	1,6 $\pm$ 0,6 (16)	1,7 $\pm$ 0,6 (14)
II	1,6 $\pm$ 1,1 (10)	1,8 $\pm$ 0,7 (9)	1,9 $\pm$ 1,1 (8)	2,1 $\pm$ 0,5 (8)
III	1,6 $\pm$ 1,1 (19)	1,6 $\pm$ 0,7 (17)	1,5 $\pm$ 0,5 (14)	1,7 $\pm$ 0,6 (11)
Q: I	1,5 $\pm$ 1,4 (6)	1,1 $\pm$ 1,3 (17)	1,0 $\pm$ 1,2 (16)	3,7 $\pm$ 3,1 (14)
II	1,9 $\pm$ 1,6 (10)	2,4 $\pm$ 1,9 ^(*+) (9)	2,9 $\pm$ 2,6 ^(**++°) (8)	3,7 $\pm$ 3,1 ^(**++°#) (8)
III	1,6 $\pm$ 1,2 (19)	1,4 $\pm$ 1,3 (17)	1,3 $\pm$ 1,6 (14)	1,9 $\pm$ 2,3 (11)

MIKROHAMODYNAMIK: TERMINALE ARTERIOLEN

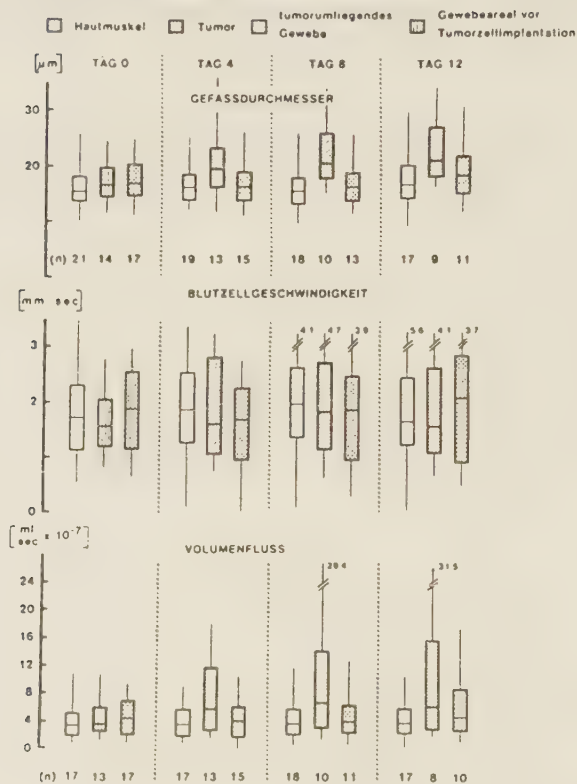


Abbildung 26:

Gefäßdurchmesser, Blutzellgeschwindigkeit und Volumenfluß der versorgenden terminalen Arteriolen des Hautmuskels, des Tumorgewebes und des tumorumliegenden Gewebes an den Tagen 0, 4, 8 und 12, sowie des Gewebeareales vor Tumorzellimplantation am Tag 0. Die Meßwerte sind in Boxplots dargestellt. Die Zahlen unter den Boxplots (n) geben die Anzahl der Meßpunkte wieder, wobei die des Volumenflusses auch für die Blutzellgeschwindigkeit gelten.

Tabelle 6

Gefäßdurchmesser (d in μm), Blutzellgeschwindigkeit (v in mm/sec) und Volumenfluß (Q in $\text{ml} \times 10^{-7} \times \text{sec}^{-1}$) der terminalen Arteriolen des Hautmuskels (I), des Tumorgewebes (II) und des tumorumliegenden Gewebes (III) an den Tagen 0, 4, 8 und 12 sowie des Gewebeareals vor Tumorzellimplantation am Tag 0 (II, Tag 0). Es sind Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung angegeben, sowie in Klammern die Anzahl der Meßpunkte. Die statistischen Vergleiche sind durch folgende Markierungen gekennzeichnet: * : Gruppe II, II vs I; + : Tag 4/8/12 vs 0; ° : 8/12 vs 4; # : 8 vs 12. Kennzeichen der Signifikanzniveaus: 1 Symbol $p < 0,05$, 2 Symbole $p < 0,01$.

Tag	0	4	8	12
d: I	17,8 $\pm$ 2,3 (21)	16,9 $\pm$ 2,5 (19)	15,8 $\pm$ 2,1 (18)	18,1 $\pm$ 2,4 (17)
II	18,4 $\pm$ 1,7 (14)	21 $\pm$ 3,9 ⁺ (13)	22,1 $\pm$ 2,9 ⁺⁺ (10)	24,1 $\pm$ 1,9 ⁺⁺ (9) #
III	18,7 $\pm$ 1,9 (17)	17,6 $\pm$ 2,7 (18)	17,9 $\pm$ 1,8 (13)	19,4 $\pm$ 2,9 (11)
v: I	1,8 $\pm$ 1,1 (17)	1,5 $\pm$ 0,9 (17)	1,8 $\pm$ 1,2 (18)	1,8 $\pm$ 1,4 (17)
II	1,6 $\pm$ 0,6 (13)	1,5 $\pm$ 0,7 (13)	1,9 $\pm$ 1,8 (10)	1,8 $\pm$ 1,7 (8)
III	1,7 $\pm$ 0,8 (17)	1,7 $\pm$ 0,6 (15)	1,6 $\pm$ 1,4 (11)	2,2 $\pm$ 1,2 ⁺ (10)
Q: I	3,1 $\pm$ 1,7 (17)	2,9 $\pm$ 1,4 (17)	2,8 $\pm$ 1,7 (18)	3,3 $\pm$ 1,4 (17)
II	3,4 $\pm$ 1,9 (13)	6,1 $\pm$ 2,7 ⁺ (13)	6,4 $\pm$ 8,1 ⁺⁺ (10)	6,5 $\pm$ 9,3 ⁺⁺ (8)
III	4,2 $\pm$ 1,4 (17)	4,3 $\pm$ 1,8 (15)	4,5 $\pm$ 2,4 ⁺ (11)	5,1 $\pm$ 2,9 ⁺ (10)

MIKROHAMODYNAMIK : PRÄKAPILLAREN

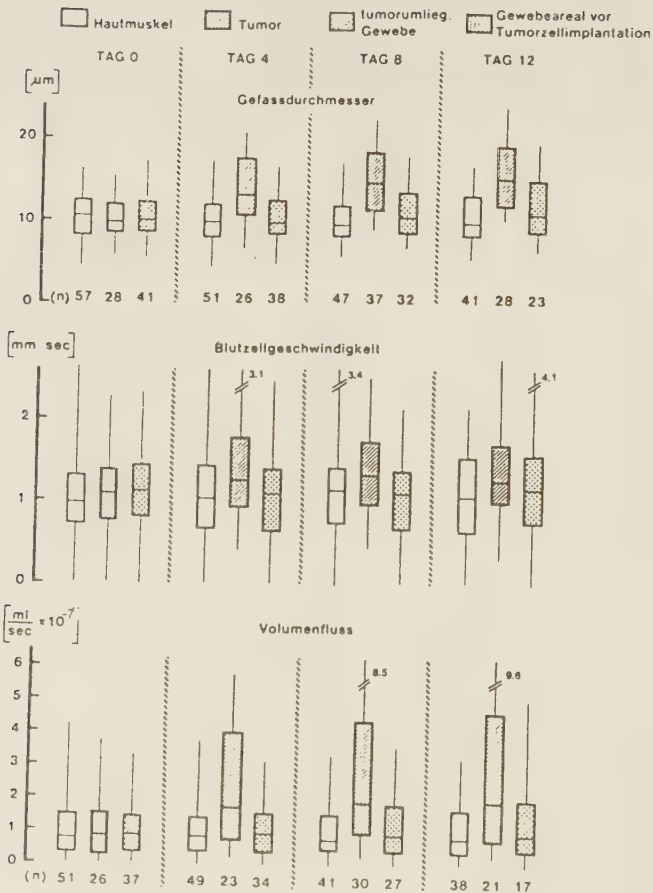


Abbildung 27:

Gefäßdurchmesser, Blutzellgeschwindigkeit und Volumenfluß der versorgenden Präkapillaren des Hautmuskels, des Tumorgewebes und des tumorumliegenden Gewebes an den Tagen 0, 4, 8 und 12, sowie des Gewebeareales vor Tumorzellimplantation am Tag 0. Die Meßwerte sind in Boxplots dargestellt. Die Zahlen unter den Boxplots (n) geben die Anzahl der Meßpunkte wieder, wobei die des Volumenflusses auch für die Blutzellgeschwindigkeit gelten.

Tabelle 7

Gefäßdurchmesser (d in μm), Blutzellgeschwindigkeit (v in mm/sec) und Volumenfluß (Q in $\text{ml} \times 10^{-4} \times \text{sec}^{-1}$) der Präkapillaren des Hautmuskels (I), des Tumorgewebes (II) und des tumorumliegenden Gewebes (III) an den Tagen 0, 4, 8 und 12 sowie des Gewebeareals vor Tumorzellimplantation am Tag 0 (II, Tag 0). Es sind Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung angegeben, sowie in Klammern die Anzahl der Meßpunkte. Statistisch signifikante Unterschiede sind durch folgende Symbole gekennzeichnet: * : Gruppe II, III vs I; + : Tag 4/8/12 vs 0; ° : Tag 8/12 vs 4. Signifikanzniveaus: 1 Symbol $p < 0,05$, 2 Symbole $p < 0,01$.

Tag		0	4	8	12
d:	I	12,1 $\pm$ 1,3 (57)	10,7 $\pm$ 1,4 (51)	10,4 $\pm$ 1,1 (47)	11,1 $\pm$ 1,7 (41)
	II	11,8 $\pm$ 1,1 (28)	14,1 $\pm$ 2,7 ^(**+) (26)	15,4 $\pm$ 3,9 ^(**++) (37)	16,9 $\pm$ 2,4 ^(**+°) (28)
	III	11,1 $\pm$ 1,3 (41)	10,9 $\pm$ 0,9 (38)	13,1 $\pm$ 1,9 ^(*+) (32)	12,7 $\pm$ 1,7 ^(*+) (23)
v:	I	0,9 $\pm$ 0,3 (51)	1,1 $\pm$ 0,4 (49)	1,2 $\pm$ 0,6 (41)	1,0 $\pm$ 0,4 (38)
	II	0,9 $\pm$ 0,3 (26)	1,4 $\pm$ 0,9 ⁽⁺⁾ (23)	1,4 $\pm$ 0,6 ^(*+) (30)	1,4 $\pm$ 0,7 ^(*+) (21)
	III	1,1 $\pm$ 0,3 (37)	1,0 $\pm$ 0,4 (34)	1,1 $\pm$ 0,3 (27)	1,2 $\pm$ 0,8 (27)
Q:	I	0,9 $\pm$ 0,7 (51)	0,9 $\pm$ 0,6 (49)	0,8 $\pm$ 0,3 (41)	0,8 $\pm$ 0,3 (38)
	II	0,9 $\pm$ 0,5 (26)	1,8 $\pm$ 1,2 ^(*+) (23)	2,1 $\pm$ 2,2 ^(**++) (30)	2,2 $\pm$ 2,1 ^(**+°) (21)
	III	1,0 $\pm$ 0,5 (37)	1,1 $\pm$ 0,4 (34)	0,9 $\pm$ 0,8 (27)	1,2 $\pm$ 0,7 (27)

bzw. hochsignifikanten Steigerungen erfuhr der Volumenfluß in diesen Gefäßabschnitten. Dies war auch durch die signifikante Zunahme der Blutzellgeschwindigkeit an den Tagen 4, 8 und 12 bedingt. Im tumorumliegenden Gewebe waren lediglich die Gefäßdurchmesser an den Tagen 8 und 12 signifikant erhöht. Weitere signifikante Unterschiede im Verlauf des Meßzeitraumes waren nicht zu beobachten.

Im Zwischengruppen-Vergleich waren erneut hochsignifikante Steigerungen der Gefäßdurchmesser an den Tagen 4, 8 und 12, signifikante Steigerungen der Blutzellgeschwindigkeiten an den Tagen 8 und 12, sowie signifikante, bzw. hochsignifikante Zunahmen des Volumenflusses an den Tagen 4, bzw. 8 und 12 im Tumor festzustellen. Auch im tumorumliegenden Gewebe waren die Gefäßdurchmesser an den Tagen 8 und 12 im Vergleich zum Normalgewebe deutlich dilatiert.

Zur statistischen Bearbeitung dieser Meßwerte wird folgendes angemerkt. Da sich auf präkapillärer Ebene im Tumorgewebe am Tag 8 und 12 nicht immer dieselben Gefäße identifizieren ließen wie am Tag 4 oder 0, mußte hierbei ein Vergleich für unverbundene Stichproben durchgeführt werden.

2.1.4. Kapillaren

In Tabelle 8 und in Abbildung 28 sind die Veränderungen von Gefäßdurchmesser, Blutzellgeschwindigkeit und Volumenfluß auf kapillärer Ebene in den einzelnen Gewebearealen über den Meßzeitraum von 12 Tagen hinweg dargestellt. Ebenso wie bei den Präkapillaren im Tumoreal wurden die Meßwerte mit einem Test für unverbundene Stichproben bearbeitet, denn über den 12-tägigen Meßzeitraum hinweg war es nicht möglich, die identischen Kapillaren und damit die identischen segmentalen Abschnitte dieser Kapillaren zu vermessen.

Über den Verlauf des Meßzeitraums hinweg zeigten sich keine statistisch faßbaren Veränderungen in der Hautmuskelmikrozirkulation. Das neugebildete Tumorkapillarsystem zeigte im Vergleich zum Gewebeareal vor Tumorzellimplantation statistisch hochsignifikant höhere Gefäßdurchmesser an den Ta-

gen 4, 8 und 12. Eine signifikante Steigerung der Gefäßdurchmesser erfuhr das Tumorgefäßsystem am Tag 12 im Vergleich zum Tag 4. Mit diesem Anstieg der Durchmesser der Tumorkapillaren einher ging eine signifikante Verminderung der Blutzellgeschwindigkeit an den Tagen 8 und 12. Dennoch war der segmentale Volumenfluß im Tumor an allen Beobachtungstagen signifikant gesteigert und erfuhr einen weiteren Anstieg am Tag 12 im Vergleich zu Tag 4. Im tumorumliegenden Gewebe war lediglich ein Anstieg des Gefäßdurchmessers am Tag 12 zu beobachten, weitere statistisch faßbare Veränderungen zeigten sich nicht.

Im Zwischengruppen-Vergleich konnten hochsignifikant erhöhte Gefäßdurchmesser im Tumorgewebe an den Tagen 4, 8 und 12 und im tumorumliegenden Gewebe signifikant erhöhte Gefäßdurchmesser am Tag 12 gemessen werden. Die Blutzellgeschwindigkeit war in den Tumorgefäßen am Tag 8 und 12 signifikant vermindert. Demgegenüber war der Volumenfluß im Tumorgewebe an den Tagen 4 und 8 signifikant und am Tag 12 hochsignifikant erhöht. Im tumorumliegenden Gewebe waren keine weiteren signifikanten Änderungen im Vergleich zum Wirtsgewebe festzustellen.

2.1.5. Postkapillaren

In Abbildung 29 und Tabelle 9 sind die Ergebnisse in den postkapillären Gefäßsegmenten dargestellt. Da in keinem der Gewebeareale die identischen Gefäßsegmente gemessen werden konnten, wurden alle Meßergebnisse statistisch wie unverbundene Stichproben bearbeitet.

In den Postkapillaren der Hautmuskelmikrozirkulation waren keine Veränderungen festzustellen.

In den Tumorgefäßen zeigte sich eine statistisch signifikante Zunahme der Gefäßdurchmesser an den Tagen 4, 8 und 12 im Verlauf des Meßzeitraumes. Die Blutzellgeschwindigkeit war am Tag 12 signifikant vermindert im Vergleich zu den Tagen 0, 4 und 8, jedoch der Volumenfluß an den Tagen 8 und 12 signifikant erhöht im Vergleich zu den Tagen 0 und 4.

Die einzige signifikante Veränderung im tumorumliegenden Gewebe war eine

MIKROHÄMODYNAMIK: KAPILLAREN

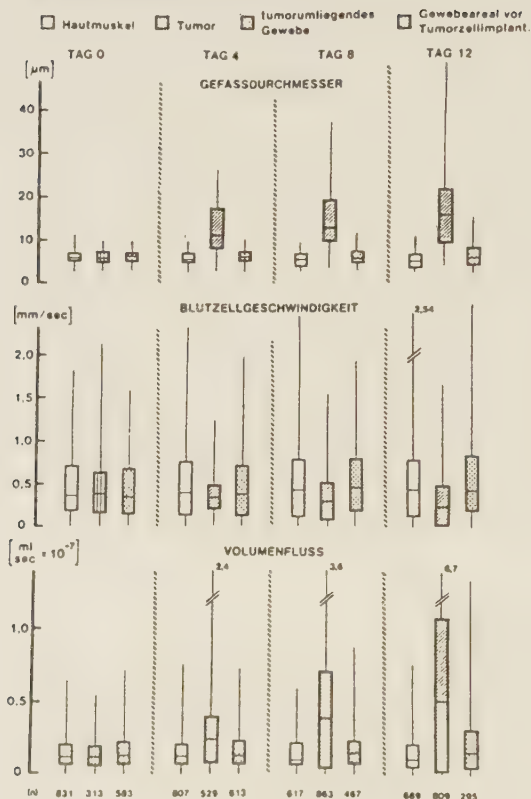


Abbildung 28:

Gefäßdurchmesser, Blutzellgeschwindigkeit und Volumenfluß der Kapillaren des Hautmuskels, des Tumorgewebes und des tumorumliegenden Gewebes an den Tagen 0, 4, 8 und 12, sowie des Gewebeareales vor Tumorzellimplantation am Tag 0. Die Meßwerte sind in Boxplots dargestellt. Die jeweils unter dem Volumenfluß angegebene Anzahl der Meßpunkte (n) gilt auch für die Blutzellgeschwindigkeit und den Gefäßdurchmesser.

Tabelle 8

Gefäßdurchmesser (d in μm), Blutzellgeschwindigkeit (v in mm/sec) und Volumenfluß (Q in $\text{ml} \times 10^{-7} \times \text{sec}^{-1}$) der Kapillaren des Hautmuskels (I), des Tumorgewebes (II) und des tumorumliegenden Gewebes (III) an den Tagen 0, 4, 8 und 12 sowie des Gewebeareals vor Tumorzellimplantation am Tag 0 (II, Tag 0). Es sind Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung angegeben, sowie in Klammern die Anzahl der Meßpunkte. Statistisch signifikante Unterschiede sind durch folgende Symbole gekennzeichnet: * : Gruppe II, III vs I; + : Tag 4/8/12 vs 0; ° : Tag 8/12 vs 4. Signifikanzniveaus: 1 Symbol $p < 0,05$, 2 Symbole $p < 0,01$.

Tag	0	4	8	12
d: I	5,9 $\pm$ 0,3 (831)	5,7 $\pm$ 0,2 (807)	5,1 $\pm$ 0,2 (617)	5,4 $\pm$ 0,2 (689)
II	6,1 $\pm$ 0,2 (313)	12,9 $\pm$ 3,4 ^{**} (529)	14,1 $\pm$ 4,6 ^{**} (863)	18,9 $\pm$ 5,2 ^{**} (809)
III	5,8 $\pm$ 0,2 (583)	6,1 $\pm$ 0,2 (613)	6,2 $\pm$ 0,2 (467)	6,5 $\pm$ 0,4 [*] (295)
v: I	0,3 $\pm$ 0,2 (831)	0,4 $\pm$ 0,2 (807)	0,4 $\pm$ 0,13 (617)	0,4 $\pm$ 0,5 (689)
II	0,3 $\pm$ 0,2 (313)	0,3 $\pm$ 0,2 (529)	0,1 $\pm$ 0,1 ⁺ (863)	0,2 $\pm$ 0,1 ⁺ (809)
III	0,3 $\pm$ 0,2 (583)	0,4 $\pm$ 0,2 (613)	0,3 $\pm$ 0,1 (467)	0,3 $\pm$ 0,2 (295)
Q: I	0,1 $\pm$ 0,1 (831)	0,1 $\pm$ 0,1 (807)	0,2 $\pm$ 0,1 (617)	0,1 $\pm$ 0,1 (683)
II	0,1 $\pm$ 0,1 (313)	0,3 $\pm$ 0,3 ⁺ (529)	0,4 $\pm$ 0,4 ⁺ (863)	0,4 $\pm$ 0,5 ⁺ (809)
III	0,1 $\pm$ 0,1 (583)	0,1 $\pm$ 0,1 (613)	0,1 $\pm$ 0,2 (467)	0,1 $\pm$ 0,3 (295)

MIKROHÄMODYNAMIK: POSTKAPILLAREN

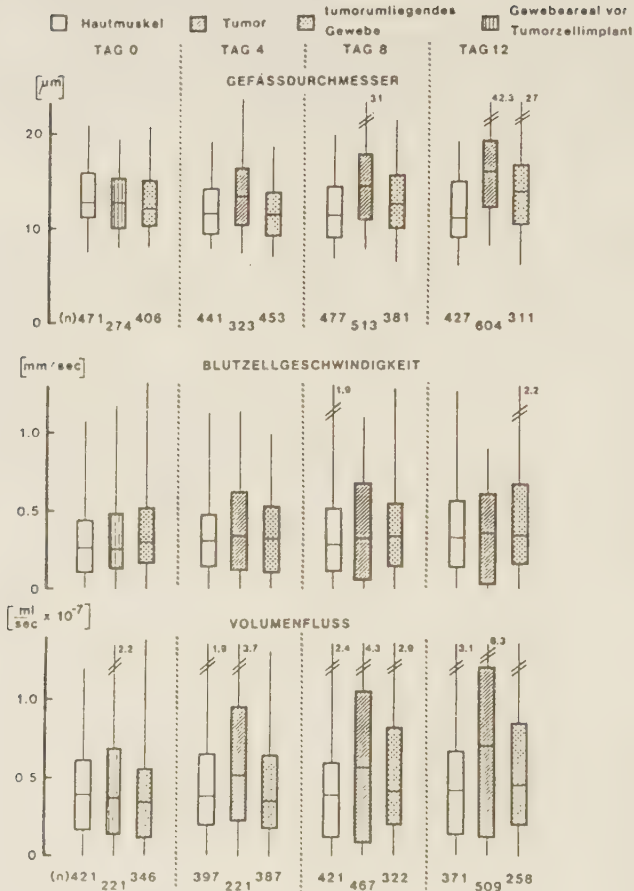


Abbildung 29:

Gefäßdurchmesser, Blutzellgeschwindigkeit und Volumenfluß der Postkapillaren des Hautmuskels, des Tumorgewebes und des tumorumliegenden Gewebes an den Tagen 0, 4, 8 und 12, sowie des Gewebeareales vor Tumorzellimplantation am Tag 0. Die Meßwerte sind in Boxplots dargestellt. Die Zahlen unter den Boxplots (n) geben die Anzahl der Meßpunkte wieder, wobei die des Volumenflusses auch für die Blutzellgeschwindigkeit gelten.

Tabelle 9

Gefäßdurchmesser (d in μm), Blutzellgeschwindigkeit (v in mm/sec) und Volumenfluß (Q in $\text{ml} \times 10^{-7} \times \text{sec}^{-1}$) der Postkapillaren des Hautmuskels (I) des Tumorgewebes (II) und des tumorumliegenden Gewebes (III) an den Tagen 0, 4, 8 und 12 sowie des Gewebeareals vor Tumorzellimplantation am Tag 0 (II, Tag 0). Es sind Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung angegeben, sowie in Klammern die Anzahl der Meßpunkte. Statistisch signifikante Unterschiede sind durch folgende Symbole gekennzeichnet : Gruppe II, III vs I; + : Tag 4/8/12 vs 0; ° : Tag 8/12 vs 4; #: Tag 8 vs 12. Signifikanzniveaus: 1 Symbol $p \leq 0,05$, 2 Symbole $p \leq 0,01$.

Tag	0	4	8	12
d: I	14,1 $\pm$ 2,1 (471)	12,8 $\pm$ 1,7 (441)	11,9 $\pm$ 1,4 (477)	11,5 $\pm$ 1,9 (427)
II	13,7 $\pm$ 1,8 (274)	15,8 $\pm$ 2,3 ⁽⁺⁾ (323)	16,2 $\pm$ 3,4 ^(**+) (513)	17,5 $\pm$ 3,7 ^(**++) (604)
III	12,9 $\pm$ 2,2 (406)	12,2 $\pm$ 2,6 (453)	14,1 $\pm$ 2,8 (381)	15,1 $\pm$ 3,2 ^(*+°) (311)
v: I	0,2 $\pm$ 0,2 (471)	0,3 $\pm$ 0,1 (441)	0,3 $\pm$ 0,3 (477)	0,3 $\pm$ 0,1 (427)
II	0,3 $\pm$ 0,1 (274)	0,3 $\pm$ 0,1 (323)	0,2 $\pm$ 0,1 (513)	0,2 $\pm$ 0,1 ^(*+°#) (604)
III	0,3 $\pm$ 0,2 (406)	0,2 $\pm$ 0,1 (453)	0,2 $\pm$ 0,1 (381)	0,3 $\pm$ 0,3 (311)
Q: I	0,3 $\pm$ 0,1 (471)	0,3 $\pm$ 0,2 (441)	0,4 $\pm$ 0,3 (477)	0,3 $\pm$ 0,2 (427)
II	0,3 $\pm$ 0,1 (274)	0,4 $\pm$ 0,2 ^(*) (323)	0,4 $\pm$ 0,4 ^(*+°) (513)	0,6 $\pm$ 0,5 ^(*+°) (604)
III	0,3 $\pm$ 0,1 (406)	0,3 $\pm$ 0,1 (453)	0,3 $\pm$ 0,3 (381)	0,4 $\pm$ 0,2 (311)

Zunahme der Gefäßdurchmesser am Tag 12 im Vergleich zu den Tagen 0 und 4. Der Zwischengruppenvergleich erbrachte signifikante bzw. hochsignifikante Zunahmen der Gefäßdurchmesser und des Volumenflusses an den Tagen 4, 8 und 12 im Tumor. Darüberhinaus war dort die Blutzellgeschwindigkeit am Tag 12 im Vergleich zum Hautmuskel signifikant vermindert. Auch im tumorumliegenden Gewebe waren die Gefäßdurchmesser im Vergleich zur Hautmuskelmikrozirkulation am Tag 12 signifikant erhöht.

2.1.6. Sammelvenolen

In Tabelle 10 und Abbildung 30 sind die Veränderungen der Mikrohämodynamik in den Sammelvenolen wiedergegeben. Wiederum wurden im Tumorgewebe die Veränderungen mit statistischen Methoden für unverbundene Stichproben überprüft. Im tumorumliegenden Gewebe, sowie im Hautmuskel wurden die Meßwerte mit Testverfahren für verbundene Stichproben statistisch überprüft, da identische Gefäßsegmente verfolgt werden konnten.

Statistisch signifikante Veränderungen im Verlauf des Meßzeitraumes konnten nur in den Tumorgefäßen gefunden werden. Der Gefäßdurchmesser war statistisch signifikant erhöht im Vergleich zum Ausgangswert, d.h. zu dem Gewebeareal vor Tumorzellimplantation, sowie am Tag 12 im Vergleich zum Tag 4. Das annähernd gleiche Verhalten zeigte der Volumenfluß. Eine signifikante Zunahme des Gefäßdurchmessers im Vergleich zum Ausgangswert zeigte sich auch im umliegenden Gewebe am Tag 12.

Im Vergleich zum Hautmuskelgewebe konnten signifikant, bzw. hochsignifikant erweiterte Gefäße im Tumor am Tag 8 und 12, sowie eine signifikante Steigerung des Volumenflusses an diesen beiden Tagen gemessen werden. Hinzu kam im tumorumliegenden Gewebe eine signifikante Steigerung des Gefäßdurchmessers am Tag 12.

2.1.7. Venolen

In Tabelle 11 und Abbildung 31 sind die Veränderungen der Mikrohämodynamik in den Venolen dargestellt.

Im Verlauf des Meßzeitraumes von 12 Tagen konnten signifikant weitere Gefäße in den Tumoren am Tag 12 im Vergleich zu den Tagen 0 und Tag 4 gemessen werden. Damit einher ging eine signifikante Zunahme des Volumenflusses am Tag 12 im Vergleich zu den Tagen 0 und 4. Eine signifikante Zunahme des Gefäßdurchmessers wurde im tumorumliegenden Gewebe am Tag 12 im Vergleich zu den Tagen 0 und 4 festgestellt.

Im Vergleich der Gewebeareale wurden an den Tagen 8 und 12 signifikant erweiterte Tumorvenolen vorgefunden. Dies war jeweils von einem signifikant erhöhten Volumenfluß begleitet. Im tumorumliegenden Gewebe war der Gefäßdurchmesser am Tag 12 signifikant erhöht.

2.1.8. Übersicht über die mikrohämodynamischen Veränderungen

Die wesentlichen Veränderungen der mikrohämodynamischen Parameter im Verlauf des Meßzeitraumes in den einzelnen Gefäßsegmenten der jeweiligen Gewebeareale, sowie die wesentlichen Befunde des Tumor- und des tumorumliegenden Gewebes im Vergleich zum Wirtsgewebe lassen sich wie folgt zusammenfassen:

Wesentlichstes und wichtigstes Ergebnis waren die unveränderten mikrohämodynamischen Parameter in der Hautmuskelmikrozirkulation. Keine statistisch signifikante Veränderung konnte im Verlauf des Meßzeitraumes gemessen werden. Daraus läßt sich ableiten, daß hier eine chronische Mikrozirkulationspräparation entwickelt wurde, die über den Beobachtungszeitraum von 12 Tagen stabile mikrohämodynamische Verhältnisse zeigte.

Die deutlichsten Veränderungen wurden im Tumorgefäßsystem gefunden. Meist waren die Gefäßdurchmesser im Vergleich zum Wirtsgefäßsystem, sowie auch im Verlauf des Tumorstadiums signifikant erhöht. Diese signifikanten Steigerungen der Gefäßdurchmesser und die deutliche arterioläre Vasodilata-

MIKROHÄMODYNAMIK: SAMMELVENOLEN

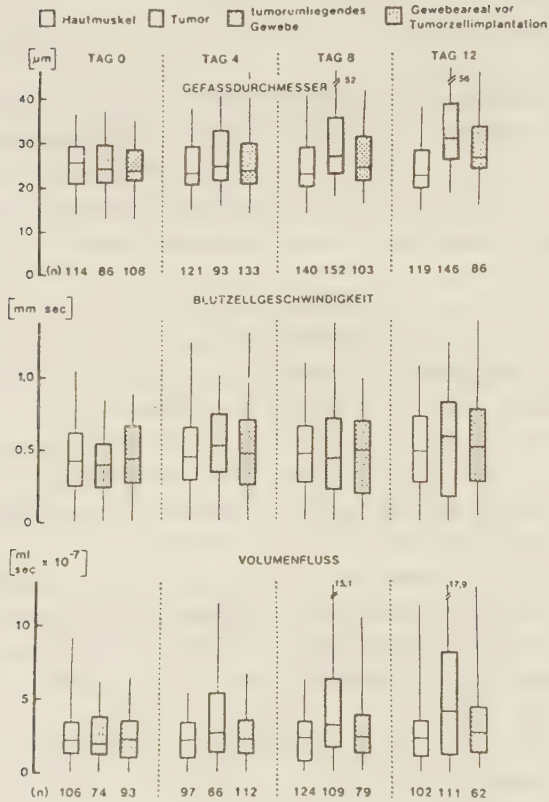


Abbildung 30:

Gefäßdurchmesser, Blutzellgeschwindigkeit und Volumenfluß der entsorgenden Sammelvenolen des Hautmuskels, des Tumorgewebes und des tumorumliegenden Gewebes an den Tagen 0, 4, 8 und 12, sowie des Gewebeareales vor Tumorzellimplantation am Tag 0. Die Meßwerte sind in Boxplots dargestellt. Die Zahlen unter den Boxplots (n) geben die Anzahl der Meßpunkte wieder, wobei die des Volumenflusses auch für die Blutzellgeschwindigkeit gelten.

Tabelle 10

Gefäßdurchmesser (d in μm), Blutzellgeschwindigkeit (v in mm/sec) und Volumenfluß (Q in $\text{ml} \times 10^{-7} \times \text{sec}^{-1}$) der Sammelvenolen des Hautmuskels (I), des Tumorgewebes (II) und des tumorumliegenden Gewebes (III) an den Tagen 0, 4, 8 und 12 sowie des Gewebeareals vor Tumorzellimplantation am Tag 0 (II, Tag 0). Es sind Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung angegeben, sowie in Klammern die Anzahl der Meßpunkte. Statistisch signifikante Unterschiede sind durch folgende Symbole gekennzeichnet: * : Gruppe II, III vs I; + : Tag 4/8/12 vs 0; ° : Tag 8/12 vs 4. Signifikanzniveaus: 1 Symbol $p < 0,05$, 2 Symbole $p < 0,01$.

Tag	0	4	8	12
d: I	24,4 $\pm$ 3,0 (114)	22,1 $\pm$ 1,9 (121)	21,5 $\pm$ 1,7 (140)	21,0 $\pm$ 1,3 (119)
II	22,1 $\pm$ 2,3 (86)	26,2 $\pm$ 3,4 ⁽⁺⁾ (93)	28,3 $\pm$ 3,2 ⁽⁺⁾ (152)	32,1 $\pm$ 4,1 ^(** + °) (146)
III	21,7 $\pm$ 3,1 (108)	23,1 $\pm$ 2,2 (133)	24,1 $\pm$ 2,7 (103)	25,6 $\pm$ 2,6 ⁽⁺⁾ (86)
v: I	0,4 $\pm$ 0,2 (106)	0,5 $\pm$ 0,2 (97)	0,4 $\pm$ 0,2 (124)	0,4 $\pm$ 0,1 (102)
II	0,4 $\pm$ 0,1 (74)	0,5 $\pm$ 0,1 (66)	0,5 $\pm$ 0,2 (109)	0,3 $\pm$ 0,2 (111)
III	0,4 $\pm$ 0,1 (93)	0,4 $\pm$ 0,2 (112)	0,4 $\pm$ 0,1 (79)	0,4 $\pm$ 0,2 (62)
Q: I	3,1 $\pm$ 0,6 (106)	1,9 $\pm$ 0,4 (97)	2,3 $\pm$ 0,2 (124)	2,7 $\pm$ 0,3 (102)
II	2,3 $\pm$ 0,4 (74)	3,4 $\pm$ 0,6 ⁽⁺⁾ (66)	5,1 $\pm$ 1,6 ⁽⁺⁾ (109)	6,3 $\pm$ 2,8 ^(* + °) (111)
III	2,0 $\pm$ 0,3 (93)	1,8 $\pm$ 0,3 (112)	2,1 $\pm$ 0,4 (79)	3,7 $\pm$ 0,9 (62)

MIKROHÄMODYNAMIK: VENOLEN

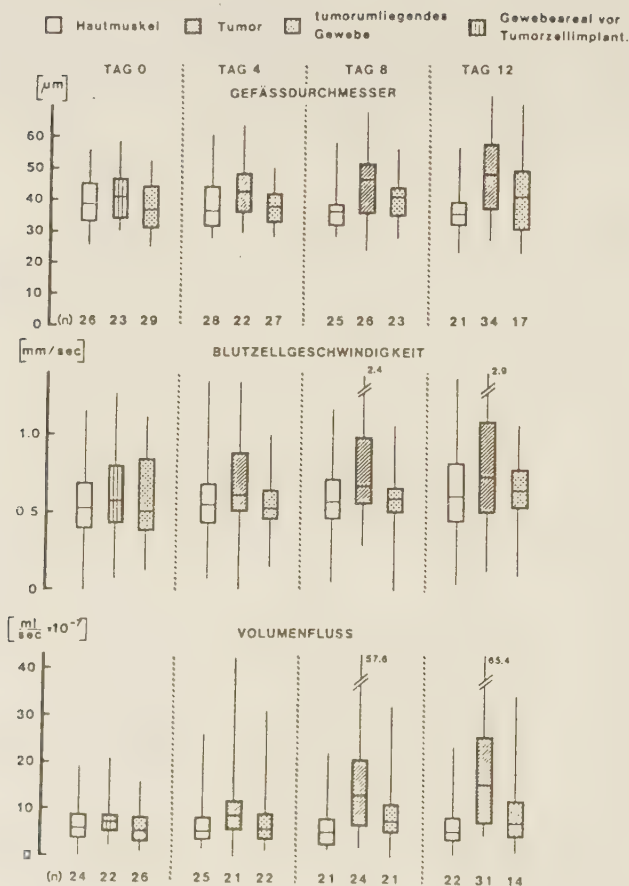


Abbildung 31:

Gefäßdurchmesser, Blutzellgeschwindigkeit und Volumenfluß der entsorgenden Venolen des Hautmuskels, des Tumorgewebes und des tumorumliegenden Gewebes an den Tagen 0, 4, 8 und 12, sowie des Gewebeareales vor Tumorzellimplantation am Tag 0. Die Meßwerte sind in Boxplots dargestellt. Die Zahlen unter den Boxplots (n) geben die Anzahl der Meßpunkte wieder, wobei die des Volumenflusses auch für die Blutzellgeschwindigkeit gelten.

Tabelle 11

Gefäßdurchmesser (d in μm), Blutzellgeschwindigkeit (v in mm/sec) und Volumenfluß (Q in $\text{ml} \times 10^{-7} \times \text{sec}^{-1}$) der Venolen des Hautmuskels (I), des Tumorgewebes (II) und des tumorumliegenden Gewebes (III) an den Tagen 0, 4, 8 und 12 sowie des Gewebeareals vor Tumorzellimplantation am Tag 0 (II, Tag 0). Es sind Mittelwerte + Standardabweichung angegeben, sowie in Klammern die Anzahl der Meßpunkte. Statistisch signifikante Unterschiede sind durch folgende Symbole gekennzeichnet: *: Gruppe II, III vs I; + : Tag 4/8/12 vs 0; ° : Tag 8/12 vs 4. Signifikanzniveaus: 1 Symbol $p < 0,05$, 2 Symbole $p < 0,01$.

Tag		0	4	8	12
d:	I	39,7 $\pm$ 2,9 (26)	35,6 $\pm$ 3,7 (28)	36,9 $\pm$ 3,7 (25)	35,1 $\pm$ 3,0 (21)
	II	41,4 $\pm$ 3,4 (23)	43,1 $\pm$ 4,1 (22)	44,0 $\pm$ 6,1 ^{(*} (26)	46,1 $\pm$ 5,3 ^(+ °) (34)
	III	38,9 $\pm$ 2,3 (29)	39,2 $\pm$ 3,2 (27)	39,6 $\pm$ 2,1 (23)	41,2 $\pm$ 4,7 ^(+ °) (17)
	I	0,5 $\pm$ 0,1 (24)	0,5 $\pm$ 0,2 (25)	0,6 $\pm$ 0,1 (21)	0,6 $\pm$ 0,2 (22)
	II	0,6 $\pm$ 0,2 (22)	0,6 $\pm$ 0,2 (21)	0,7 $\pm$ 0,6 (24)	0,7 $\pm$ 0,7 (31)
	III	0,5 $\pm$ 0,1 (26)	0,5 $\pm$ 0,1 (22)	0,6 $\pm$ 0,1 (21)	0,6 $\pm$ 0,1 (14)
Q:	I	7,3 $\pm$ 1,6 (24)	7,0 $\pm$ 1,6 (25)	7,2 $\pm$ 1,7 (21)	7,6 $\pm$ 1,3 (22)
	II	8,1 $\pm$ 2,1 (22)	11,1 $\pm$ 2,9 (21)	13,4 $\pm$ 9,3 ^{(*} (24)	14,1 $\pm$ 10,1 ^(+ °) (31)
	III	7,4 $\pm$ 1,4 (26)	8,4 $\pm$ 2,2 (22)	9,1 $\pm$ 4,1 (21)	9,3 $\pm$ 5,2 (14)

tion waren häufig von einer Zunahme des segmentalen Volumenflusses begleitet.

Im tumorumliegenden Hautmuskelgewebe wurden ebenso wie im Hautmuskel nahezu keine Veränderungen beobachtet. Lediglich am Tag 12 konnten statistisch signifikante Zunahmen der Gefäßdurchmesser sowie auch signifikante Steigerungen des segmentalen Volumenflusses gemessen werden. Ähnliche Veränderungen wurden am Tag 8 nach Tumorzellimplantation beobachtet. Diese Veränderungen im tumorumliegenden Gewebe wurden vor allem dann gemessen, wenn dieses Gewebeareal bis in die Ödemzone des Tumors hineinreichte.

2.2.1. Veränderungen der Kapillarlängen

Abbildung 32 und Tabelle 12 geben die unterschiedlichen Kapillarlängen in den verschiedenen Gewebearealen wieder. Die von Kapillarabzweigung zu Kapillarabzweigung gemessenen Kapillarlängen im Tumor waren im Vergleich zum Hautmuskel und zum Hautmuskelareal vor Tumorzellimplantation hochsignifikant vermindert. Im Verlauf des Meßzeitraumes waren innerhalb des Tumorgewebes keine weiteren signifikanten Unterschiede gemessen worden.

An dieser Stelle darf auf die Meßmethodik hingewiesen werden. Aufgrund der chaotischen Anordnung und der häufigen Krümmung der Tumorgefäße ist für die Messung der Kapillarlängen im Tumor mit einer Abweichung pro Meßwert von etwa $10\text{ }\mu\text{m}$ zu rechnen. Selbst bei Einbeziehung derartiger Abweichungen blieben die angegebenen Signifikanzniveaus unverändert.

2.2.2. Kapillardichte

Die bisher dargestellten Daten der mikrohäodynamischen Veränderungen und der Kapillarlängen gaben jeweils Meßwerte wieder, die an einzelnen Gefäßsegmenten erhoben wurden. Diese Ergebnisse lassen deshalb keine Beurteilung der Gesamtversorgung bzw. -entsorgung der untersuchten mikrozyklatorischen Gefäßnetzwerke zu.

In Ergänzung der vorher dargestellten mikrohämodynamischen Parameter wurde deshalb die Kapillardichte pro Gewebeeinheit bestimmt.

Zunächst ist in Abbildung 33 und Tabelle 13 die Kapillardichte aller mit FITC-Dextran gefüllten Kapillaren dargestellt. Dies gibt jedoch nicht das nutritive Kapillarnetz wieder. Denn damit werden nicht nur die erythrozytenperfundierten Kapillaren bestimmt, sondern auch diejenigen, die lediglich von Plasma durchströmt werden, bzw. auch diese Kapillaren, in denen eine Stase der Erythrozyten vorliegt. Mit der Kapillardichte wird jedoch die nutritive Kapazität des Kapillarsystems beschrieben.

Im Verlauf des Meßzeitraumes wurden keine signifikanten Veränderungen im Hautmuskel und im tumorumliegenden Hautmuskel gemessen. Im Tumor war die Kapillardichte pro Gewebeeinheit am Tag 4 im Vergleich zum Wirtsgewebe vor Tumorzellimplantation am Tag 0 signifikant erhöht. Im weiteren Verlauf des Tumorzellwachstums zeigte sich im Tumorgewebe kontinuierlich eine signifikante Verminderung der Kapillardichte pro Gewebeeinheit. Damit war L_A am Tag 12 auch im Vergleich zum Gewebeareal vor Tumorzellimplantation signifikant reduziert. Im Zwischengruppenvergleich zeigte sich im Tumor eine signifikante Erhöhung der Kapillardichte am Tag 4 und eine signifikante Verminderung am Tag 12.

2.2.3. Kapillardichte der erythrozytenperfundierten Kapillaren

Wie im vorhergehenden Abschnitt unter 2.2.2. ausgeführt, gibt die Kapillardichte per se nicht die Gefäßdichte der an der Nutrition beteiligten Kapillaren wieder. Es wurde deshalb separat die Kapillardichte der erythrozytenperfundierten Kapillaren bestimmt. Als nicht perfundierte Kapillaren wurden diejenigen gewertet, die nur von Plasma durchströmt waren, bzw. diejenigen, in denen eine Stase der Erythrozyten beobachtet werden konnte.

Die Veränderungen der Kapillardichte der erythrozytenperfundierten Kapillaren sind in Tabelle 14 und Abbildung 34 dargestellt. Im Verlauf des Beobachtungszeitraumes waren weder im Hautmuskel noch im tumorumliegenden Ge-

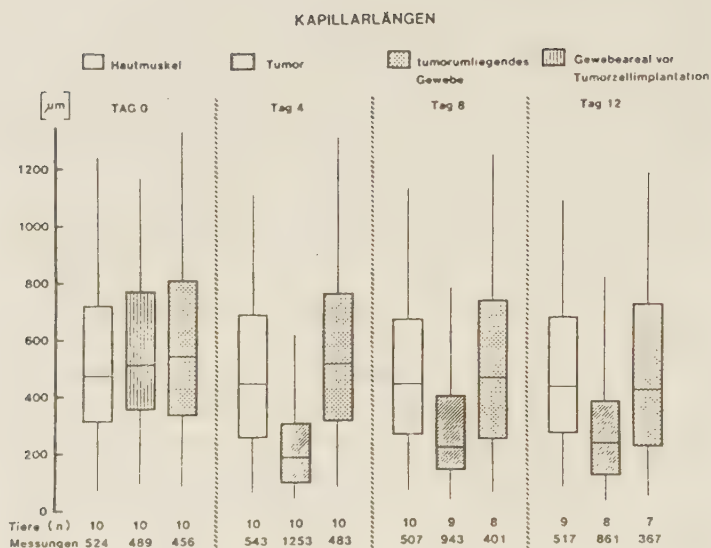


Abbildung 32:

Kapillarlängen des Hautmuskels, des Tumorgewebes und des tumorumliegenden Gewebes an den Tagen 0, 4, 8 und 12, sowie des Gewebeareales vor Tumorzellimplantation am Tag 0. Die Meßwerte sind in Boxplots dargestellt. Unter den Boxplots sind die Anzahl der Tiere (n) und der Meßpunkte angegeben.

Tabelle 12

Kapillarlängen (μm) des Hautmuskels (I), des Tumorgewebes (II) und des tumorumliegenden Gewebes (III) an den Tagen 0, 4, 8 und 12 sowie des Gewebeareals vor Tumorzellimplantation am Tag 0 (II, Tag 0). Es sind die Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung angegeben, sowie in Klammern die Anzahl der Meßpunkte. Statistisch signifikante Unterschiede sind durch folgende Symbole gekennzeichnet: * : Gruppe II, III vs I; + : Tag 4/8/12 vs 0. Signifikanzniveaus: 1 Symbol $p < 0,05$, 2 Symbole $p < 0,01$.

Tag	0	4	8	12
I	504 $\pm$ 93 (524)	450 $\pm$ 71 (543)	412 $\pm$ 77 (507)	447 $\pm$ 79 (517)
II	568 $\pm$ 72 (489)	181 $\pm$ 43 ^(**++) (1253)	201 $\pm$ 40 ^(**++) (943)	227 $\pm$ 54 ^(**++) (861)
III	592 $\pm$ 109 (456)	507 $\pm$ 114 (483)	467 $\pm$ 83 (401)	489 $\pm$ 92 (367)

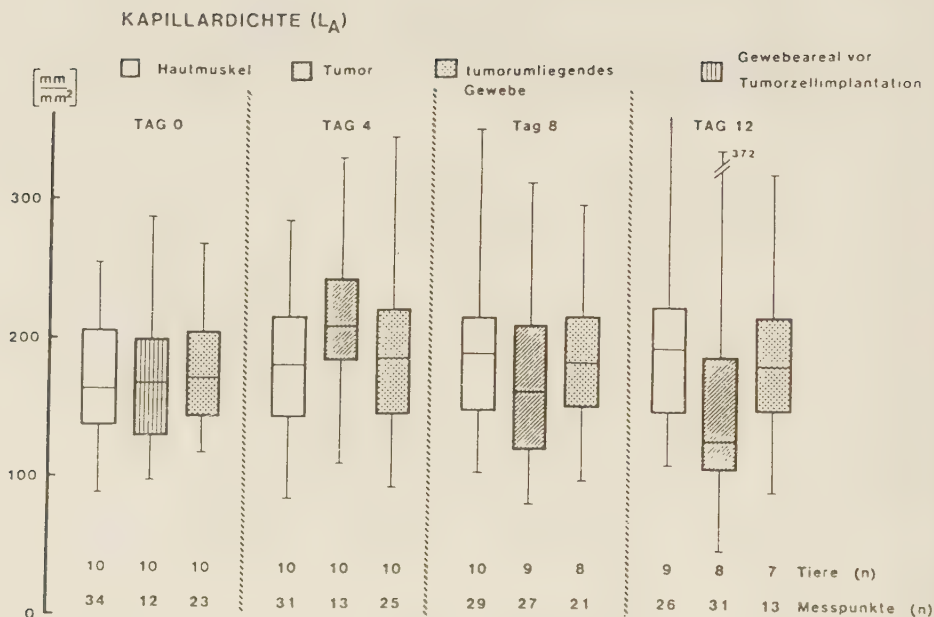


Abbildung 33:

Kapillardichte des Hautmuskels, des Tumorgewebes und des tumorumliegenden Gewebes an den Tagen 0, 4, 8 und 12, sowie des Gewebeareales vor Tumorzellimplantation am Tag 0. Die Meßwerte sind in Boxplots dargestellt. Unter den Boxplots sind die Anzahl der Tiere und der Meßpunkte angegeben.

Tabelle 13

Kapillardichte (L_A in mm/mm^2) des Hautmuskels (I), des Tumorgewebes (II) und des tumorumliegenden Gewebes (III) an den Tagen 0, 4, 8 und 12 sowie des Gewebeareals vor Tumorzellimplantation am Tag 0 (II, Tag 0). Es sind Mittelwerte + Standardabweichung angegeben, sowie in Klammern die Anzahl der Meßpunkte. Statistisch signifikante Unterschiede sind durch folgende Symbole gekennzeichnet: *: Gruppe II, III vs I; + : Tag 4/8/12 vs 0; ° : Tag 8/12 vs 4; # : Tag 8 vs 12. Signifikanzniveaus: 1 Symbol $p < 0,05$, 2 Symbole $p < 0,01$.

Tag	0	4	8	12
I	181 $\pm$ 27 (34)	193 $\pm$ 41 (31)	198 $\pm$ 63 (29)	219 $\pm$ 102 (26)
II	193 $\pm$ 45 (12)	221 $\pm$ 51 ^(*+) (13)	159 $\pm$ 89 ^(°) (27)	126 $\pm$ 124 ^(*+ ° #) (31)
III	201 $\pm$ 38 (23)	184 $\pm$ 78 (25)	189 $\pm$ 58 (21)	188 $\pm$ 42 (13)

KAPILLARDICHTE (L_A) ERYTHROZYPENPERFUNDIERTE KAPILLAREN

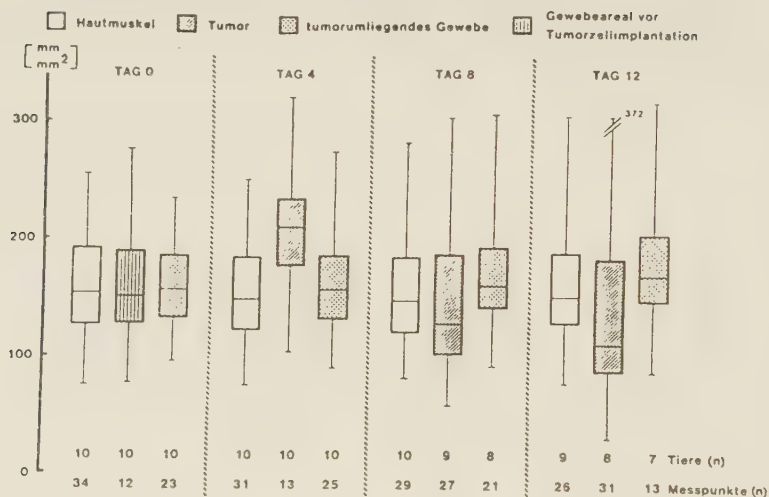


Abbildung 34:

Kapillardichte der erythrozytenperfundierten Kapillaren des Hautmuskels, des Tumorgewebes und des tumorumliegenden Gewebes an den Tagen 0, 4, 8 und 12, sowie des Gewebeareales vor Tumorzellimplantation am Tag 0. Die Meßwerte sind in Boxplots dargestellt. Unter den Boxplots sind die Anzahl der Tiere und der Meßpunkte angegeben.

Tabelle 14

Kapillardichte (L_A in mm/mm^2) der erythrozytenperfundierten Kapillaren des Hautmuskels (I), des Tumorgewebes (II) und des tumorumliegenden Gewebes (III) an den Tagen 0, 4, 8 und 12 sowie des Gewebeareals vor Tumorzell-implantation am Tag 0 (II Tag 0). Es sind Mittelwerte + Standardabweichung angegeben, sowie in Klammern die Anzahl der Meßpunkte. Statistisch signifikante Unterschiede sind durch folgende Symbole gekennzeichnet: *: Gruppe II, III vs I; + : Tag 4/8/12 vs 0; ° : Tag 8/12 vs 4. Signifikanzniveaus: 1 Symbol $p < 0,05$, 2 Symbole $p < 0,01$.

Tag	0	4	8	12
I	161 $\pm$ 31 (34)	153 $\pm$ 47 (31)	144 $\pm$ 56 (29)	169 $\pm$ 29 (26)
II	158 $\pm$ 43 (12)	213 $\pm$ 39 ⁺ (13)	125 $\pm$ 53 ^{°*} (27)	117 $\pm$ 63 ^{°*} (31)
III	169 $\pm$ 29 (23)	174 $\pm$ 36 (25)	171 $\pm$ 41 (21)	179 $\pm$ 36 (13)

webe signifikante Veränderungen der Kapillardichte zu verzeichnen. Im neugebildeten Tumorgewebe war dagegen eine signifikant gesteigerte Kapillardichte der erythrozytenperfundierten Kapillaren im Vergleich zum Wirtsgewebe vor Tumorzellimplantation zu beobachten. Im weiteren Verlauf des Tumorstadiums war die Kapillardichte der erythrozytenperfundierten Kapillaren im Tumor am Tag 8 und Tag 12 signifikant gegen den Meßwert am Tag 4 vermindert.

Der Meßwert im Tumor am Tag 4 war auch gegenüber den Werten im Hautmuskel signifikant erhöht. Die beiden Werte im Tumorgewebe am Tag 8 und Tag 12 waren gegenüber der Vergleichsgruppe signifikant vermindert.

2.2.4. Anteil der nicht perfundierten Kapillaren

Der prozentuale Anteil der nicht perfundierten Kapillaren beschreibt den Kapillaranteil, in dem nur eine Plasmadurchströmung, bzw. eine Stase der Erythrozyten zu beobachten war. Die Ergebnisse sind in Abbildung 35 und Tabelle 15 wiedergegeben.

Am Tag 0 zeigten sich keine wesentlichen Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen in dem prozentualen Anteil der nicht perfundierten Kapillaren, er lag im Mittel bei etwa 6,5 %. In dem neugebildeten Tumorgefäßnetz waren am Tag 4 nahezu kaum Kapillaren zu entdecken, die nicht von Erythrozyten perfundiert worden waren. Demgegenüber war der prozentuale Anteil in dem Hautmuskelareal der nicht tumortragenden Tiere und in dem tumorumliegenden Gewebe leicht, jedoch nicht signifikant angestiegen. Im Verlauf des Tumorstadiums war im Tumorgewebe eine hochsignifikante Zunahme der nicht perfundierten Kapillaren zu beobachten. Am Tag 8 entsprach der Wert dem im umliegenden Gewebe und im Hautmuskel. Innerhalb des Tumorgewebes fand am Tag 12 eine weitere signifikante Zunahme der nicht perfundierten Kapillaren statt. Schließlich waren ca 24 % der Kapillaren im Tumor nicht perfundiert. Dieser Meßwert war signifikant erhöht gegenüber dem Hautmuskel und hochsignifikant gegenüber der Vormessung im Tumorgewebe am Tag 4. Die Messungen im tumorumliegenden Gewebe am Tag 12 zeigten signifikant ver-

minderte Werte im Vergleich zu allen vorangegangenen Tagen, sowie auch im Vergleich zum Hautmuskel.

Aufgrund des hohen Anteils der nicht perfundierten Kapillaren im Tumor am Tag 12 ist auch verständlich, daß die mittlere Blutzellgeschwindigkeit in den Tumorgefäßen am Tag 12 signifikant gegenüber der in den Hautmuskellkapillaren reduziert war (siehe 1.2.4.)

2.2.5. Kapillaroberfläche

Aus der Kapillardichte und einem mittleren Kapillardurchmesser wurden jeweils die Kapillaroberflächen pro Gewebeareal bestimmt. Die Meßwerte sind in Abbildung 36 und in Tabelle 16 wiedergegeben.

Innerhalb des Meßzeitraumes von 12 Tagen konnten weder im Hautmuskel noch im tumorumliegenden Gewebe signifikante Veränderungen gegenüber dem jeweiligen Ausgangswert gemessen werden. Im Tumorgewebe konnte bereits am Tag 4 eine deutlich erhöhte Kapillaroberfläche mit einer Steigerung um etwa 100 % gegenüber dem Wirtsgewebe gemessen werden und erfuhr eine weitere Steigerung auf 150 % am Tag 12. Diese Veränderungen im Tumorgewebe waren hochsignifikant gegenüber dem Hautmuskel, bzw. gegenüber dem Wirtsgewebe vor Tumorzellimplantation. Der Wert innerhalb des Tumorgewebes am Tag 12 war gegenüber dem am Tag 4 signifikant erhöht.

Allein aus diesem rechnerisch ermittelten Wert der Kapillaroberfläche können jedoch keine Schlußfolgerungen hinsichtlich des effektiven transmembranalen Austausches über den Gefäßwall der Tumorgefäße hinweg gezogen werden. Hierfür müßten neben den regional unterschiedlichen Flüssen auch die osmotisch wirksamen Druckgradienten bekannt sein. Diese konnten jedoch in den vorliegenden Untersuchungen nicht bestimmt werden. Die ausgeprägte Steigerung der Kapillaroberfläche im Tumor im Vergleich zu der Kapillaroberfläche des Wirtsgewebes zeigt jedoch an, daß das Tumorgefäßsystem eine enorme Kapazität für Austauschvorgänge hat.

PROZENTUALER ANTEIL NICHT-PERFUNDIERTER KAPILLAREN

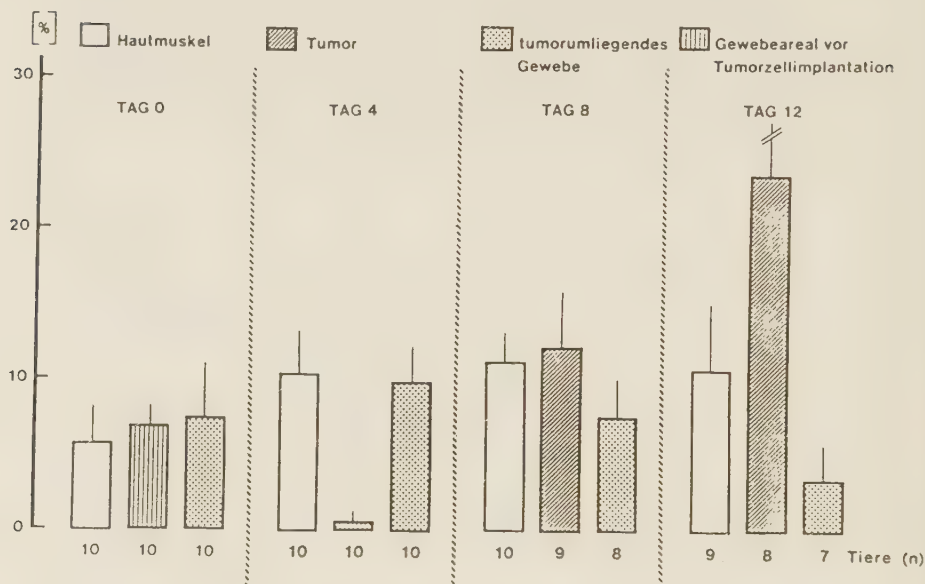


Abbildung 35:

Prozentualer Anteil nicht erythrozyten-perfundierter Kapillaren im Haut-muskel, im Tumorgewebe und im tumorumliegendem Gewebe an den Tagen 0, 4, 8 und 12, sowie im Gewebeareal vor Tumorzellimplantation am Tag 0. Die Meßwerte sind als Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung dargestellt. Unter den Säulen ist jeweils die Anzahl der gemessenen Tiere (n) angegeben.

Tabelle 15

Prozentualer Anteil nicht-erythrozytenperfundierter Kapillaren des Hautmuskels (I), des Tumorgewebes (II) und des tumorumliegenden Gewebes (III) an den Tagen 0, 4, 8 und 12 sowie des Gewebeareals vor Tumorzellimplantation am Tag 0 (II, Tag 0). Es sind Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung angegeben, sowie in Klammern die Anzahl der Meßpunkte. Statistisch signifikante Unterschiede sind durch folgende Symbole gekennzeichnet: *: Gruppe II, III vs I; + : Tag 4/8/12 vs 0; ° : Tag 8/12 vs 4; #: Tag 8 vs 12. Signifikanzniveaus: 1 Symbol $p < 0,05$, 2 Symbole $p < 0,01$.

Tag	0	4	8	12
I	5,7 $\pm$ 2,5 (10)	10,3 $\pm$ 3,2 (10)	11,1 $\pm$ 1,9 (10)	10,7 $\pm$ 3,3 (9)
II	6,6 $\pm$ 1,4 (10)	0,6 $\pm$ 1,6 ^(*) (10)	12,2 $\pm$ 2,8 ^(+ °) (9)	23,4 $\pm$ 7,3 ^(**+ ° #) (8)
III	7,3 $\pm$ 3,7 (10)	9,7 $\pm$ 2,4 (10)	7,4 $\pm$ 2,1 (8)	3,4 $\pm$ 2,4 ^(*+ ° #) (7)

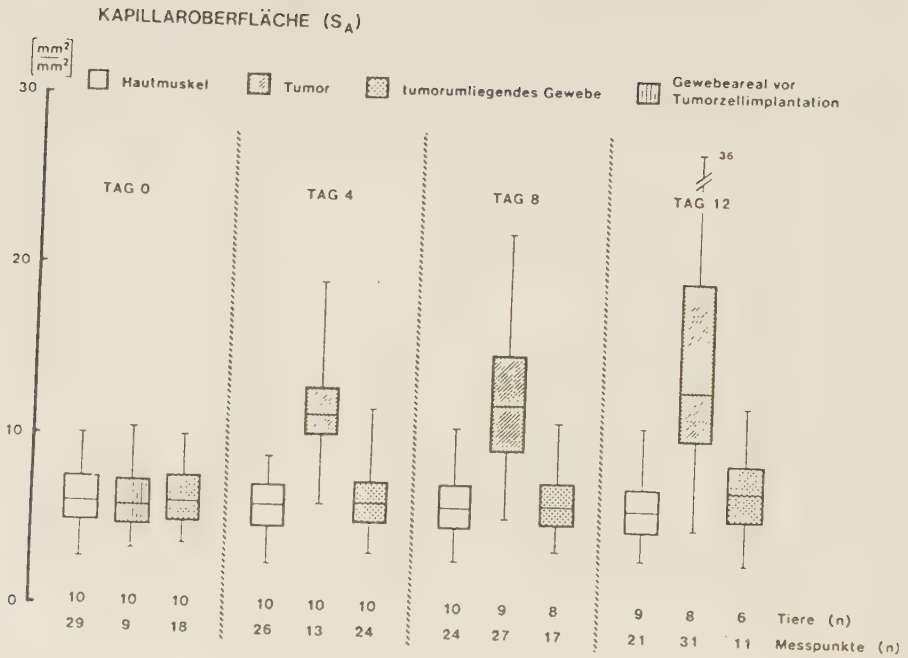


Abbildung 36:

Kapillaroberfläche des Hautmuskels, des Tumorgewebes und des tumorumliegenden Gewebes an den Tagen 0, 4, 8 und 12, sowie des Gewebeareales vor Tumorzellimplantation am Tag 0. Die Meßwerte sind in Boxplots dargestellt. Unter den Boxplots sind die Anzahl der Tiere (n) und der Meßpunkte angegeben.

Tabelle 16

Kapillaroberfläche (S_A in mm^2/mm^2) des Hautmuskels (I), des Tumorgewebes (II) und des tumorumliegenden Gewebes (III) an den Tagen 0, 4, 8 und 12 sowie des Gewebeareals vor Tumorzellimplantation am Tag 0 (II, Tag 0). Es sind Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung angegeben, sowie in Klammern die Anzahl der Meßpunkte. Statistisch signifikante Unterschiede sind durch folgende Symbole gekennzeichnet: *: Gruppe II, III vs I; + : Tag 4/8/12 vs 0; °: Tag 8/12 vs 4. Signifikanzniveaus: 1 Symbol $p < 0,05$, 2 Symbole $p < 0,01$.

Tag	0	4	8	12
I	$6,0 \pm 1,2$ (29)	$6,6 \pm 1,3$ (26)	$6,0 \pm 1,7$ (24)	$5,7 \pm 1,4$ (21)
II	$6,3 \pm 2,1$ (9)	$11,4 \pm 4,7^{**}$ (13)	$12,3 \pm 4,2^{**}$ (27)	$15,3 \pm 5,6^{**}$ (31)
III	$5,9 \pm 1,7$ (18)	$6,8 \pm 2,4$ (24)	$6,9 \pm 2,4$ (17)	$7,7 \pm 2,9$ (9)

2.2.6. Mikrohämatokrit

Die mit einem sehr hohen zeitlichen Aufwand verbundenen quantitativen Messungen des Mikrohämatokrites wurden nach der von SARELIUS und DULING (Sarelius und Duling, 1982) dargestellten Methodik bestimmt.

Zunächst wurde der Anteil an markierten Erythrozyten an der zirkulierenden Erythrozytengesamtpopulation im Tier bestimmt. Anschließend wurden durch Bild-zu-Bild-Analyse die Erythrozytenfließgeschwindigkeit der fluoreszenzmarkierten Erythrozyten, die Gefäßdurchmesser und die Anzahl der fließenden Erythrozyten pro Zeiteinheit ermittelt. Aus diesen Meßgrößen, die hier im einzelnen nicht dargestellt sind, da sie bis auf die Erythrozytenflüsse pro Zeiteinheit nur eine Wiederholung der bisher berichteten Ergebnisse darstellen würden, wird nur der Mikrohämatokrit in den einzelnen Gefäßsegmenten der gemessenen Tiere dargestellt.

In Abbildung 37 sind die Einzelmessungen des Mikrohämatokrites (H_{mikro}) als Quotient zum systemischen Hämatokrit (H_{sys}) im Hautmuskel am Tag 4 wiedergegeben. Es zeigte sich, daß der Mikrohämatokrit wesentlich unterhalb dem systemischen Hämatokrit lag. Dies war aufgrund des in Mikrogefäßen geltenden Fahreus-Lindquist-Effekts, auch für dieses Gefäßsystem zu erwarten. Die Meßwerte korrelierten mit den von SARELIUS und DULING beschriebenen Werten für die Hamsterbackentasche (Sarelius und Duling, 1982).

In Abbildung 38 ist der Mikrohämatokrit in den Gefäßen des Tumorgewebes und des tumorumliegenden Gewebes an den Tagen 4 und 8 dargestellt. Jeweils 3 Tiere wurden an den beiden Tagen gemessen. Es war in beiden Gewebearealen festzustellen, daß auch hier der Mikrohämatokrit unterhalb dem systemischen Hämatokrit lag. Es ist jedoch ganz deutlich aus der Verteilung der Einzelmessungen zu ersehen, daß der Mikrohämatokrit in den Tumorgefäßen, die ja alle kapillärer Natur sind, weit höher lag, als diejenigen Meßwerte in den Kapillaren des umliegenden Gewebes oder des Hautmuskels am Tag 4.

Zur besseren Vergleichbarkeit der einzelnen kapillären Mikrohämatokrite sind diese als Boxplots in Abbildung 39 und Tabelle 17 dargestellt. Der Medianwert im Tumor lag bei etwa 0,5, demgegenüber waren die Medianwerte im Hautmuskel und im tumorumliegenden Gewebe bei etwa 0,3 zu finden. Am Tag 8

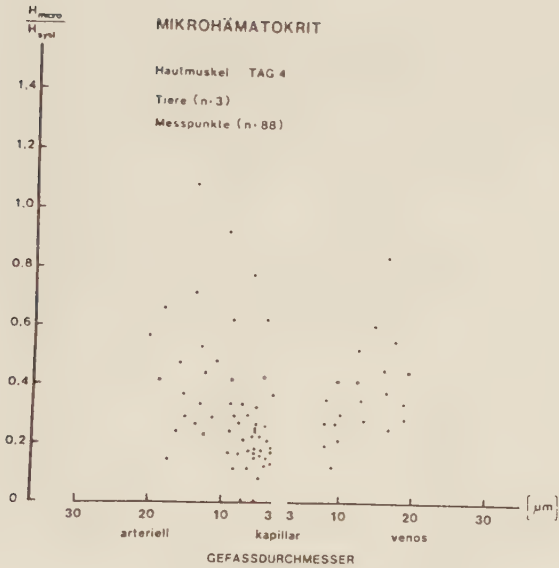


Abbildung 37:

Der Mikrohämatokrit in den Gefäßen des Hautmuskels am Tag 4. Die einzelnen Meßwerte wurden in terminalen Arteriolen, Präkapillaren, Kapillaren, Postkapillaren und kleinen Venolen erhoben. Der Mikrohämatokrit ist als Quotient zum systemischen Hämatokrit angegeben.

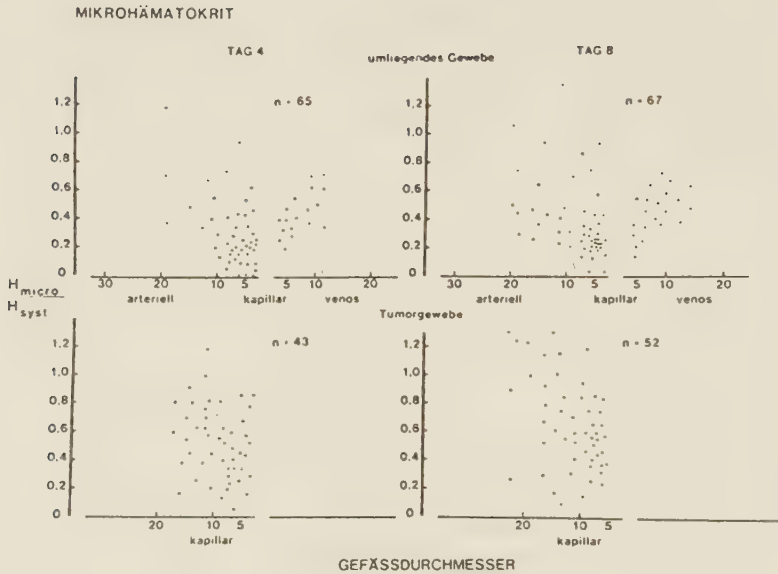


Abbildung 38:

Der Mikrohämatokrit in den Gefäßen des Tumorgewebes und des tumorumliegenden Gewebes an den Tagen 4 und 8. Es wurden jeweils 3 Tiere an den Tagen 4 und 8 gemessen. Der Mikrohämatokrit ist als Quotient zum systemischen Hämatokrit angegeben.

KAPILLÄRER MIKROHÄMATOKRIT

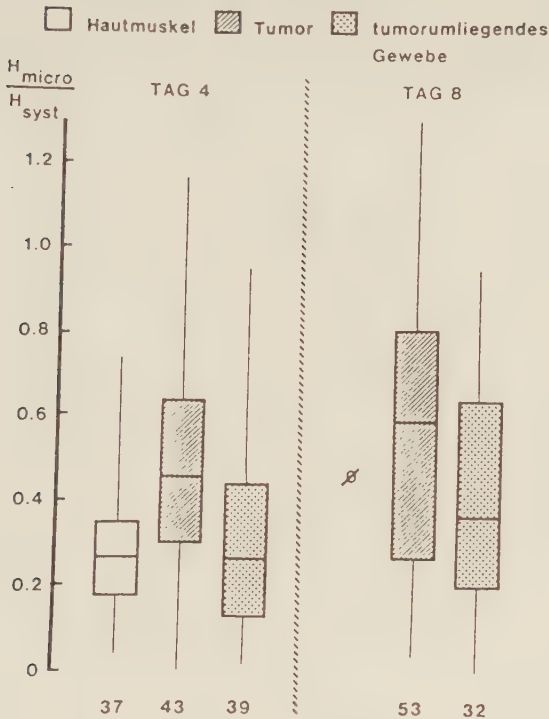


Abbildung 39:

Mikrohämatokrit in den Kapillaren des Hautmuskels, des Tumorgewebes und des tumorumliegenden Gewebes an den Tagen 4 und 8. Der Mikrohämatokrit ist als Quotient zum systemischen Hämatokrit angegeben. Die Meßwerte sind in Boxplots dargestellt. Unter den Boxplots sind jeweils die Einzelmessungen angegeben. Für Tag 8 liegen aus den Hautmuskelpapillaren keine Meßergebnisse vor.

Tabelle 17

Mikrohämatokrit in Kapillaren des Hautmuskels (I), des Tumorgewebes (II) und des tumorumliegenden Gewebes (III) an den Tagen 4 und 8. Der Mikrohämatokrit ist als Quotient zum systemischen Hämatokrit angegeben. Die Meßwerte sind als Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung wiedergegeben. Unter dem Meßwert ist jeweils die Anzahl der Messungen angegeben, sowie in Klammern die Anzahl der Meßpunkte. Statistisch signifikante Unterschiede sind durch folgende Symbole gekennzeichnet: * : Gruppe II an den Tagen 4 und 8 vs Gruppe I am Tag 4; + : Tag 8 vs Tag 4. Signifikanzniveaus: 1 Symbol $p < 0,05$, 2 Symbole $p < 0,01$.

Tag	4	8
I	0,27 $\pm$ 0,21 (37)	
II	0,45 $\pm$ 0,38 ^(*) (43)	0,59 $\pm$ 0,37 ^{(*)+} (53)
III	0,28 $\pm$ 0,31 (39)	0,29 $\pm$ 0,34 (32)

konnte im Tumor ein weiterer Anstieg des Mikrohämatokrites auf 0,6 gemessen werden. Im Tumorgefäßbett lag damit ein drastischer Anstieg des Mikrohämatokrites im Vergleich zu den Kapillaren des umliegenden Gewebeareals und des Hautmuskels vor. Die Meßwerte im Tumor waren gegenüber den beiden anderen Gruppen signifikant erhöht, sowohl am Tag 4 als auch am Tag 8. Während des Tumorwachstums fand im Tumor eine weitere signifikante Steigerung des Mikrohämatokrites statt.

2.3. Verhalten des Gewebeoberflächen- pO_2

2.3.1. Gewebeoberflächen- pO_2 des subcutanen Hautmuskels

Die Gewebeoberflächen- pO_2 -Werte des Hautmuskels sind als sogenannte pO_2 -Histogramme in Abbildung 40 dargestellt. Im Verlauf des Meßzeitraumes von 12 Tagen waren im subcutanen Hautmuskel der Hamsterkammerpräparation keine drastischen Veränderungen der pO_2 -Werte zu beobachten. Die Mittelwerte lagen zwischen 28,5 und 31,3 mmHg. Neben den mikrohämodynamischen Messungen dokumentiert insbesondere die Gewebeoberflächen- pO_2 -Messung die Stabilität der Hamsterrückenhautkammerpräparation über diesen Beobachtungszeitraum. Insbesondere wurde auch deutlich, daß das mehrmalige Abnehmen des transparenten Fensters keine wesentlichen Einwirkungen auf die Mikrozirkulation der untersuchten Gewebeareale zeigte.

2.3.2. Gewebeoberflächen- pO_2 des amelanotischen Hamstermelanoms A-Mel-3

Um ein ungestörtes Tumorwachstum zu ermöglichen, wurde am Tag der Tumorzellinokulation keine Messung in dem Gewebeareal durchgeführt, in das die Tumorzellen implantiert worden waren. Die erste Messung des Gewebeoberflächen- pO_2 erfolgte nach vollständiger Kapillarisation in dem Gewebereich der Tumorzellimplantation am Tag 4. Der Mittelwert der pO_2 -Hi-

OBERFLÄCHEN pO_2 DES SUBCUTANEN HAUTMUSKELS

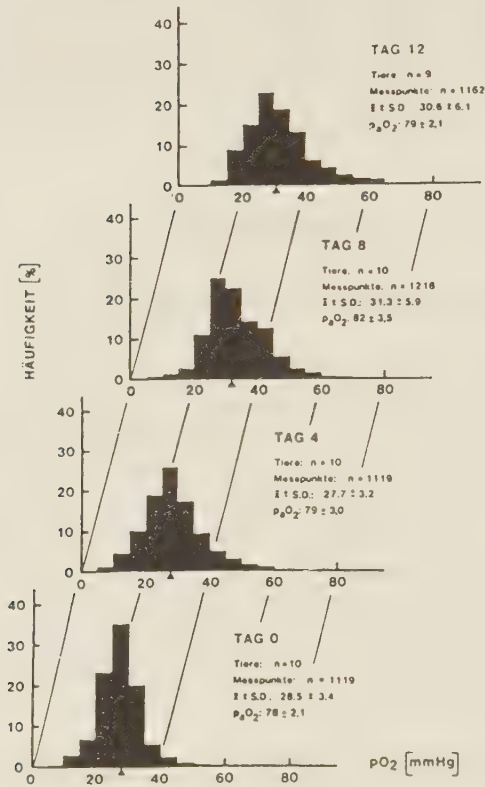


Abbildung 40:

Oberflächen- pO_2 -Histogramme des subcutanen Hautmuskels an den Tagen 0, 4, 8 und 12. Angegeben sind die Anzahl der Tiere und der Meßpunkte, der arithmetische Mittelwert des Histogramms $\pm$ Standardabweichung und der arithmetische Mittelwert des $p_a O_2 \pm$ Standardabweichung.

OBERFLÄCHEN pO_2 DES AMELANOTISCHEN
HAMSTERMELANOMS A-MEL-3

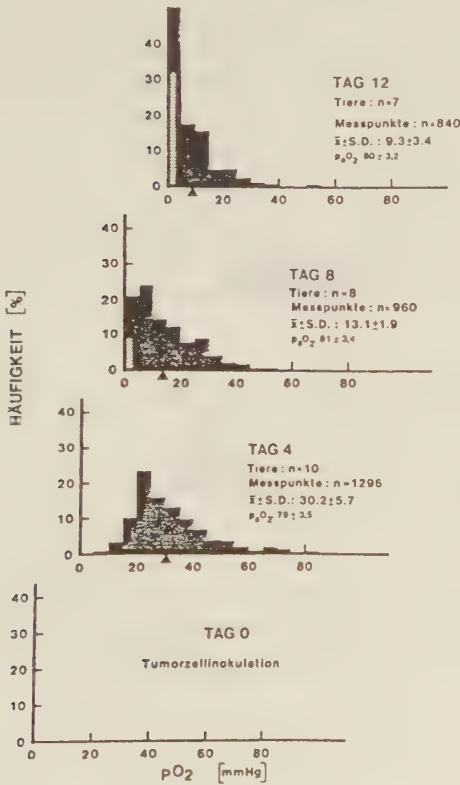


Abbildung 41:

Oberflächen- pO_2 -Histogramme des amelanotischen Hamstermelanoms A-Mel-3 an den Tagen 4, 8 und 12. Angegeben sind die Anzahl der Tiere und der Meßpunkte, der arithmetische Mittelwert des Histogramms $\pm$ Standardabweichung und der arithmetische Mittelwert des $\bar{p}_aO_2 \pm$ Standardabweichung. Am Tag der Tumorzellimplantation wurde keine Messung des Oberflächen- pO_2 durchgeführt.

stogramme lag bei 30 mmHg (Abbildung 41).

Es waren zu diesem Zeitpunkt keine hypoxischen Werte im Tumor vorzufinden. Am Tag 8 zeigte sich eine deutliche Linksverschiebung des pO_2 -Summenhistogramms mit nahezu 30 % der Werte im hypoxischen bzw. anoxischen Bereich. 8 % der pO_2 -Werte fielen auf 0 mmHg ab. Der Mittelwert dieses pO_2 -Histogramms lag bei 13 mm Hg. Am Tag 12 war im Tumor eine weitere Verschiebung des pO_2 -Summenhistogramms zu niedrigeren pO_2 -Werten zu verzeichnen. Nahezu 80 % der pO_2 -Werte lagen im hypoxischen bzw. im anoxischen Bereich. Mehr als 30 % der Messungen zeigten 0 mm Hg. Dies war ein deutliches Anzeichen für eine Tumorphypoxie bzw. Anoxie.

2.3.3. Gewebeoberflächen- pO_2 des tumorumliegenden Gewebes

Im Hautmuskel des tumorumliegenden Gewebes zeigten sich die in Abbildung 42 dargestellten Veränderungen der Gewebeoberflächen- pO_2 -Summenhistogramme. Das Ausgangshistogramm am Tag 4 zeigte eine ähnliche Verteilung wie dasjenige in den nicht tumortragenden Tieren. Das Summenhistogramm war am Tag 8 nahezu identisch, am Tag 12 wurde jedoch eine starke Verbreiterung des pO_2 -Summenhistogrammes gemessen. Dies könnte als Ausdruck der z.T. vorliegenden Hyperämie in den gemessenen Arealen gewertet werden.

2.3.4. Gewebeoberflächen- pO_2 -Messungen - Übersicht

Abbildung 43 und 44 stellen die Mittelwerte der Gewebeoberflächen- pO_2 -Summenhistogramme dar. Sowohl die Darstellung in Boxplots (Abbildung 43) als auch die Darstellung der Mittelwerte des Oberflächen- pO_2 in den Gewebearealen zeigt deutlich an, daß eine signifikante Verminderung des Gewebeoberflächen- pO_2 im Tumor am Tag 8 und Tag 12 zu beobachten war. Der statistische Vergleich erbrachte eine signifikante Verminderung am Tag 8 und Tag 12 im Verlauf des Tumorwachstums ($p < 0,01$), sowie auch im Vergleich zum Hautmuskel an diesen beiden Tagen ($p < 0,01$). Dies war auch Ausdruck einer

OBERFLÄCHEN pO_2 DES TUMORUMLIEGENDEN GEWEBES

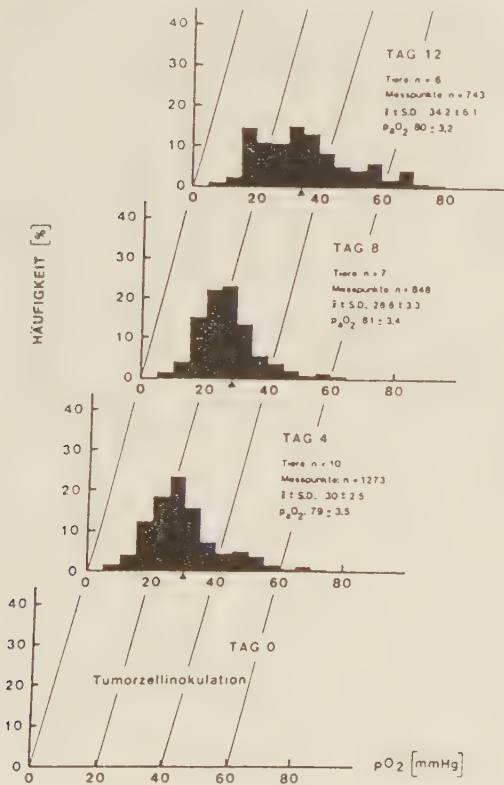


Abbildung 42:

Oberflächen- pO_2 -Histogramme des tumorumliegenden Gewebes an den Tagen 4, 8 und 12. Angegeben sind die Anzahl der Tiere und der Meßpunkte, der arithmetische Mittelwert des Histogramms $\pm$ Standardabweichung und der arithmetische Mittelwert des $p_a O_2 \pm$ Standardabweichung. Am Tag der Tumorzellimplantation wurde keine Messung des Oberflächen- pO_2 durchgeführt.

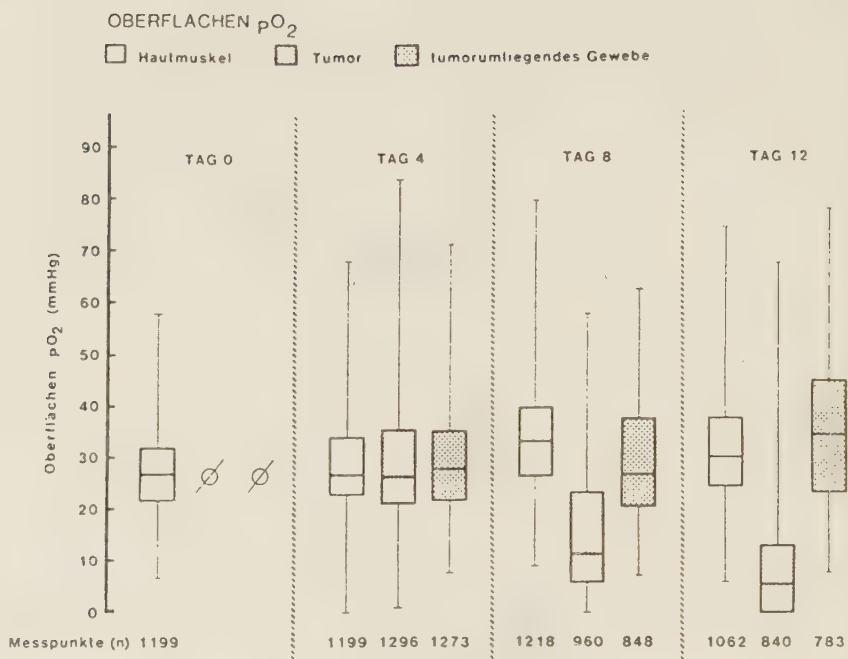


Abbildung 43:

Oberflächen- pO_2 des subcutanen Hautmuskels, des Tumorgewebes und des tumorumliegenden Gewebes an den Tagen 0, 4, 8 und 12. Die Meßwerte sind in Boxplots dargestellt. Unter den jeweiligen Säulen ist die Anzahl der Meßpunkte (n) angegeben.

MITTELWERTE DES OBERFLÄCHEN pO_2 DES HAUTMUSKELS (●), DES TUMORS (○) UND DES TUMORUMLIEGENDEN GEWEBES (▲)

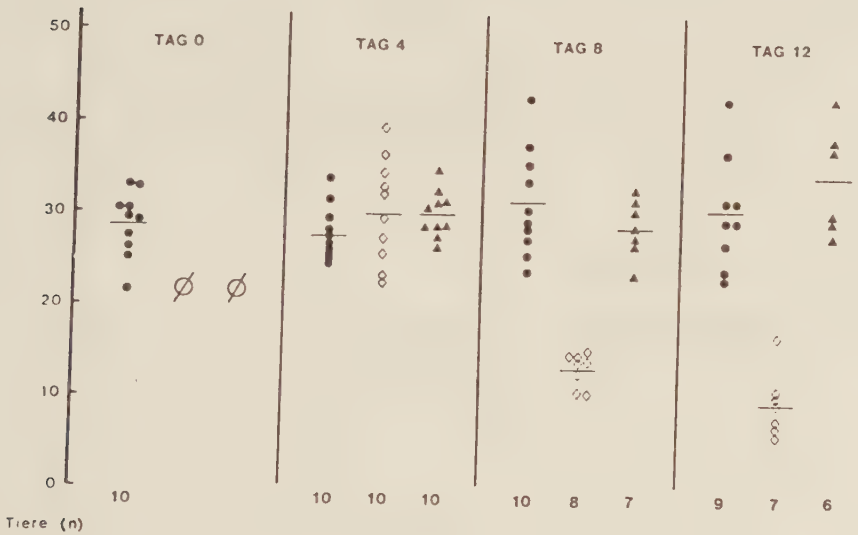


Abbildung 44:

Einzeldarstellung der Mittelwerte der Oberflächen- pO_2 -Histogramme des Hautmuskels, des Tumors und des tumorumliegenden Gewebes an den Tagen 0, 4, 8 und 12. Der innerhalb der einzelnen Punktwolken angegebene horizontale Strich kennzeichnet jeweils den Mittelwert der Mittelwerte. Am unteren Bildrand ist die Anzahl der gemessenen Tiere (n) angegeben.

deutlichen Gewebehypoxie in den Tumoren. Es lag demnach eine Minderversorgung im Tumor an den Tagen 8 und 12 vor.

2.4. Vergleich mikrozirkulatorischer Messungen im Tumorzentrum und im Tumorrandgebiet

2.4.1. Mikrohämodynamik

Gefäßdurchmesser, Blutzellgeschwindigkeit und Volumenfluss des Tumorrandgebietes und des Tumorzentrums wurden am Tag 8 und 12 verglichen und sind in Abbildung 45 und Tabelle 18 dargestellt. Der statistische Vergleich dieser Parameter in beiden Arealen zeigte im Tumorrandbereich signifikant (Tag 8), bzw. hochsignifikant (Tag 12) erweiterte Gefäße im Vergleich zum Tumorzentrum. Dies war anhand photomakroskopischer Aufnahmen bereits zu vermuten. Mit diesen eindeutigen Veränderungen der Gefäßdurchmesser einher gingen ein signifikant, bzw. hochsignifikant höherer Volumenfluß im Tumorrandbereich. Darüberhinaus war auch die Blutzellgeschwindigkeit im Tumorrandgebiet am Tag 12 signifikant gesteigert.

2.4.2. Kapillardichte, Anteil nicht perfundierter Kapillaren, Gewebeerflächen- pO_2

Der Vergleich dieser Meßgrößen ist in Abbildung 46 und in Tabelle 19 wiedergegeben. Am Tag 8 und 12 konnten im Tumorrandbereich im Vergleich zum Tumorzentrum hochsignifikant höhere Werte der Kapillardichte, ein hochsignifikant verminderter Anteil an nicht perfundierten Kapillaren und ein hochsignifikant erhöhter Gewebeerflächen- pO_2 gemessen werden.

Der Vergleich von Tumorrand und Tumorzentrum in 2.4.1. und 2.4.2. zeigte, daß enorme Unterschiede mikrozirkulatorisch bedeutsamer Parameter innerhalb des Tumorgewebes vorlagen. Die erhöhte Kapillardichte bei gleichzeitig reduzierter Anzahl nicht perfundierter Kapillaren, der gesteigerte Volumenfluß und die höheren pO_2 -Werte waren Ausdruck der erhöhten nutritiven Versorgung und Entsorgung im Tumorrandbereich. Das Tumorzentrum war bereits zu diesem frühen Zeitpunkt, Tag 8 und Tag 12 des Tumorwachstums, minderversorgt. Deshalb zeigte sich bereits zu diesem frühen Zeitpunkt eine Gewebehypoxie. Ursache war unter anderem die stark verminderte Kapillardichte bei gleichzeitigem hohen Anteil an nicht perfundierten Kapillaren, die z.T. über 30 % betrug und der stark verminderte segmentale Volumenfluß.

3. Permeabilität für Makromoleküle

Die photomakroskopischen Aufnahmen zeigten, daß eine Graduierung der Permeabilitätsänderungen mit dem vorgegebenen Schema durchaus möglich war. Eine Quantifizierung derartiger photomakroskopischer Aufnahmen war jedoch nicht möglich. In den Normalgewebspräparationen (Gruppe I) konnte im Versuchszeitraum von 12 Tagen keine erhöhte Permeabilität für Makromoleküle nachgewiesen werden, d.h. Stadium 0 war über den gesamten Beobachtungszeitraum vorhanden.

Als Ausdruck einer intakten Mikrozirkulationspräparation waren auch keine sog. 'leaky spots', d.h. keine fokalen Austritte von FITC-Dextran zu beobachten (Svensjö et al., 1979).

Demgegenüber wurde im Tumorgefäßsystem bereits am Tag 4 ein frühzeitiger Austritt von FITC-Dextran festgestellt. Dies kündigte sich zu Beginn als multipler fokaler Austritt an und war nach etwa 15 Minuten als homogener Fluoreszenzaustritt aus dem Intravasalraum zu beobachten, d.h. ein rascher Übergang von Stadium 1 nach Stadium 2.

Bei höheren Vergrößerungen im Intravitalmikroskop, d.h. bei den mikrozirku-

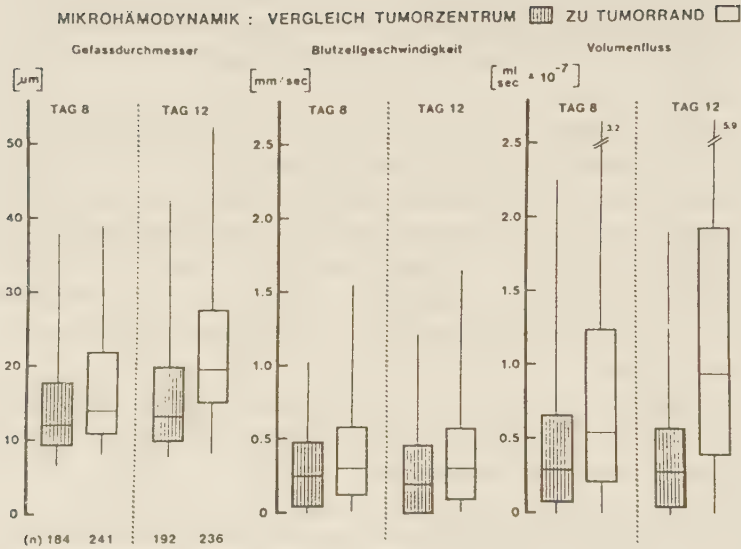


Abbildung 45:

Vergleich mikrozirkulatorischer Messungen des Tumorzentrums zu denen des Tumorrandgebietes an den Tagen 8 und 12. Die Meßwerte der Kapillardichte, und des Oberflächen- pO_2 sind in Boxplots, die des Anteils der nichtperfundierten Kapillaren jeweils als arithmetischer Mittelwert $\pm$ Standardabweichung dargestellt. Unter den Säulen ist jeweils die Anzahl der Einzelmessungen (n) angegeben.

Tabelle 18

Gefäßdurchmesser (d in μm), Blutzellgeschwindigkeit (v in mm/sec) und Volumenfluß (Q in $\text{ml} \times 10^{-4} \times \text{sec}^{-1}$) der Kapillaren des Tumorzentrums und des Tumorrandgebietes an den Tagen 8 und 12. Es sind Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung angegeben, sowie in Klammern die Anzahl der Meßpunkte. Statistisch signifikante Unterschiede sind durch folgende Symbole gekennzeichnet: * : Tumorrand vs Tumorzentrum; + : Tag 12 vs 8. Signifikanzniveaus: 1 Symbol $p < 0,05$, 2 Symbole $p < 0,01$.

Tag	8	12
d: Tumorzentrum	$12,7 \pm 4,6$ (189)	$12,9 \pm 5,7$ (192)
Tumorrand	$14,6 \pm 6,1^{(*)}$ (241)	$22,8 \pm 7,8^{(**+)}$ (236)
v: Tumorzentrum	$0,2 \pm 0,1$ (189)	$0,1 \pm 0,1$ (192)
Tumorrand	$0,3 \pm 0,2$ (241)	$0,3 \pm 0,3^{(*)}$ (236)
Q: Tumorzentrum	$0,3 \pm 0,4$ (189)	$0,3 \pm 0,6$ (192)
Tumorrand	$0,7 \pm 1,2^{(*)}$ (241)	$0,9 \pm 1,4^{(**+)}$ (236)

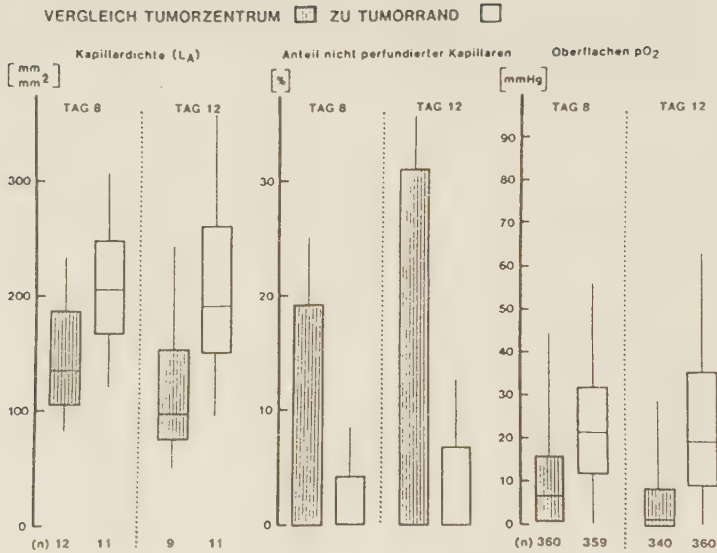


Abbildung 46:

Vergleich der mikrohämodynamischen Parameter des Tumorzentrums zu denen des Tumorrandgebietes an den Tagen 8 und 12. Die Meßwerte der Gefäßdurchmesser, Blutzellgeschwindigkeiten und der Volumenflüsse sind in Boxplots dargestellt. Die unter den Boxplots des Gefäßdurchmessers angegebene Anzahl der Meßwerte (n) gilt entsprechend für die Blutzellgeschwindigkeit und den Volumenfluß.

Tabelle 19

Kapillardichte (L_A in mm/mm^2), Anteil der nicht-perfundierten Kapillaren und Mittelwerte der Oberflächen-Gewebe- pO_2 -Histogramme des Tumorzentrums und des Tumorrandgebietes an den Tagen 8 und 12. Es sind Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung angegeben, sowie in Klammern die Anzahl der Meßpunkte. Statistisch signifikante Unterschiede sind durch folgende Symbole gekennzeichnet: *: Tumorrand vs Tumorzentrum; + : Tag 12 vs 8. Signifikanzniveau: 1 Symbol $p < 0,05$, 2 Symbole $p < 0,01$

Tag		8	12
LA:	Tumorzentrum	137 ± 37 (12)	107 ± 34 (9)
	Tumorrand	$217 \pm 46^{**}$ (11)	$201 \pm 53^{**}$ (11)
Kap:	Tumorzentrum	$19,1 \pm 5,9$	$30,9 \pm 4,6$
	Tumorrand	$4,2 \pm 3,2^{**}$	$6,6 \pm 5,7^{**}$
pO_2 :	Tumorzentrum	$4,1 \pm 4,7$ (360)	$1,9 \pm 1,7$ (359)
	Tumorrand	$20,1 \pm 5,2^{**}$ (340)	$19,6 \pm 4,2^{**}$ (360)

latorischen Untersuchungen machte sich dies jedoch nicht bemerkbar, da der relative intravasale Anteil des FITC-Dextrans unmittelbar nach Injektion höher war als im Interstitium des Tumors.

Im fortgeschrittenen Tumorstadium, d.h. am Tag 8 und 12, war anhand der photomakroskopischen Aufnahmen und der mikroskopischen Beobachtungen zu erkennen, daß die Extravasation der Makromoleküle rascher ablief und auch an Intensität zunahm, d.h. das Stadium 2 war bereits nach wenigen Minuten manifest. Da jedoch eine Quantifizierung der photomakroskopischen und mikroskopischen Aufnahmen nicht möglich war, konnte dies nur anhand der subjektiven Klassifizierung postuliert werden.

Im tumorumliegenden Gewebe konnten wir an den Tagen 8 und 12 in der Mehrzahl der Versuche keine gesteigerte Permeabilität für Makromoleküle beobachten. Lediglich in den Fällen, in denen der Tumor an diesen Bereich heranreichte, d.h. insbesondere am Tag 12, zeichneten sich Permeabilitätssteigerungen für Makromoleküle auch in diesem Bereich ab, wobei diese erhöhte Extravasation nur sehr schwer und z.T. überhaupt nicht von Tumorrandödem differenziert werden konnte.

Darüberhinaus lagerte sich das FITC-Dextran auch in den Gefäßwänden ab. Dies war, wie in 1.3.2. bereits dargestellt, auch in diesen Bereichen Zeichen der beginnenden Neovaskularisation. Das Gefäßsystem zeigte in den dann folgenden Tagen eine Neoangiogenese und das neugebildete Gefäßsystem wurde in den Tumor integriert. Dies konnte in mehr als 50 % der Präparationen, die mehr als 12 Tage verfolgt wurden, beobachtet werden.

4. Histologische und elektronenmikroskopische Untersuchungen

Die im folgenden dargestellten histologischen und elektronenmikroskopischen Abbildungen stellte freundlicherweise Herr Prof. Dr. med. F. Hammersen (Direktor des Anatomischen Institutes an der Technischen Universität München) zur Verfügung, dem ich an dieser Stelle für sein Entgegenkommen, seine Unterstützung besonders herzlich danke.

Im folgenden soll nun weder detailliert auf die Angiogenese, noch zu speziell auf elektronenmikroskopische Befunde der ausdifferenzierten Tumore eingegangen werden. Hierzu wird auf die von Prof. Hammersen veröffentlichten Fachartikel verwiesen (Hammersen et al., 1983, Hammersen et al., 1985c).

Die Semi-Dünnschnitte in Abbildung 47 bis 51 zeigen hierbei folgende Besonderheiten:

Abbildungen 47 und 48 belegen die unterschiedliche Dicke der einzelnen Hautkammerpräparationen. In Abbildung 47 sieht man im Vergleich zu Abbildung 48 eine wesentlich höhere Anzahl an Fettzellen und in Abbildung 48 sind die quergestreiften Hautmuskelfasern quergeschnitten dargestellt. Besonders hervorzuheben ist, daß die Mastzellen in diesen Präparationen nicht degranuliert sind. Dies wurde unter anderem als Beweis für die Intaktheit dieser chronischen Mikrozirkulationspräparationen bewertet. Für die Stabilität der Präparationen sprach weiterhin, daß sich am Tag 7 kein wesentlicher Schwund der Muskelfasern zeigte, und auch zu diesem Zeitpunkt keine Degranulation der Mastzellen festzustellen war. Aus der Gegenüberstellung einer Normalgewebspräparation und einer Tumorgewebspräparation in Abbildung 49 wird deutlich, daß durch das Tumorwachstum die Hautmuskelstränge auseinandergedrängt werden. Es zeigen sich in diesem histologischen Schnitt nahezu keine Mastzellen. Darüberhinaus gewinnt man aus der Vergrößerung des zentralen Tumorgefäßes in Abbildung 50 den Eindruck, daß hier möglicherweise kein Tumorgefäßendothel vorliegt. Dem widerspricht jedoch die elektronenmikroskopische Abbildung 56, in der sich ein sehr dünnes und ausgezogenes Endothel dieses Gefäßes (Tag 7 nach Tumorzellimplantation) zeigt. In Abbildung 51 sind lakunenartige Tumorgefäße zu erkennen. Wirtsgewebe und

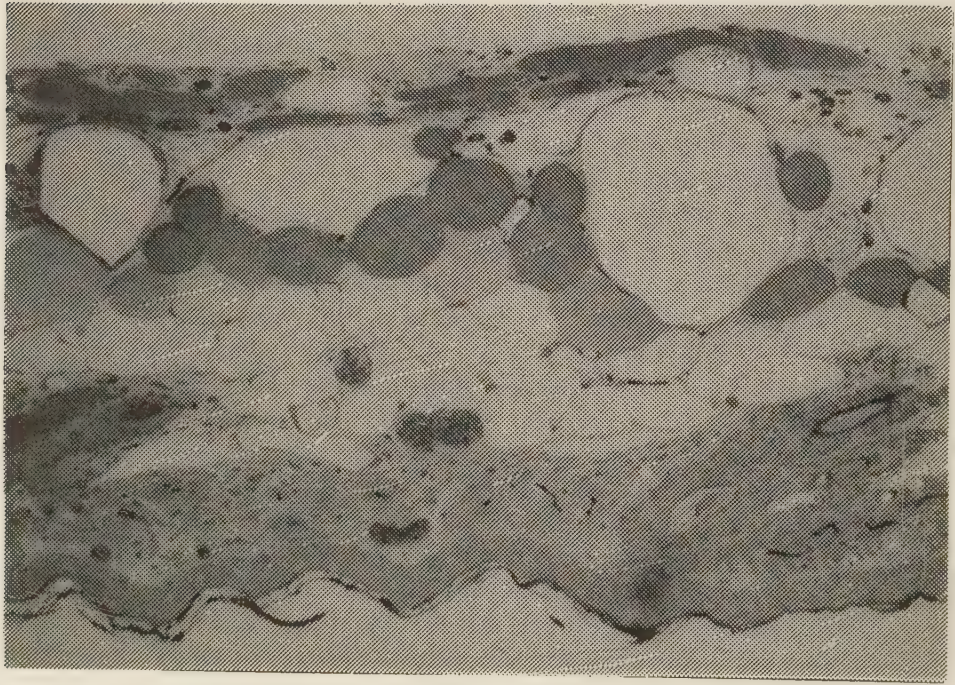


Abbildung 47:

Semidünnschnitt durch eine Hautkammerpräparation 72 Stunden nach Kammerimplantation. Die Mastzellen sind nicht degranuliert. Dies ist als Beweis der Intaktheit des Gewebes anzusehen. Am unteren Bildrand ist die Haut deutlich zu erkennen. Färbung: Methylenblau-Azur II; Gesamtvergrößerung 50-fach.

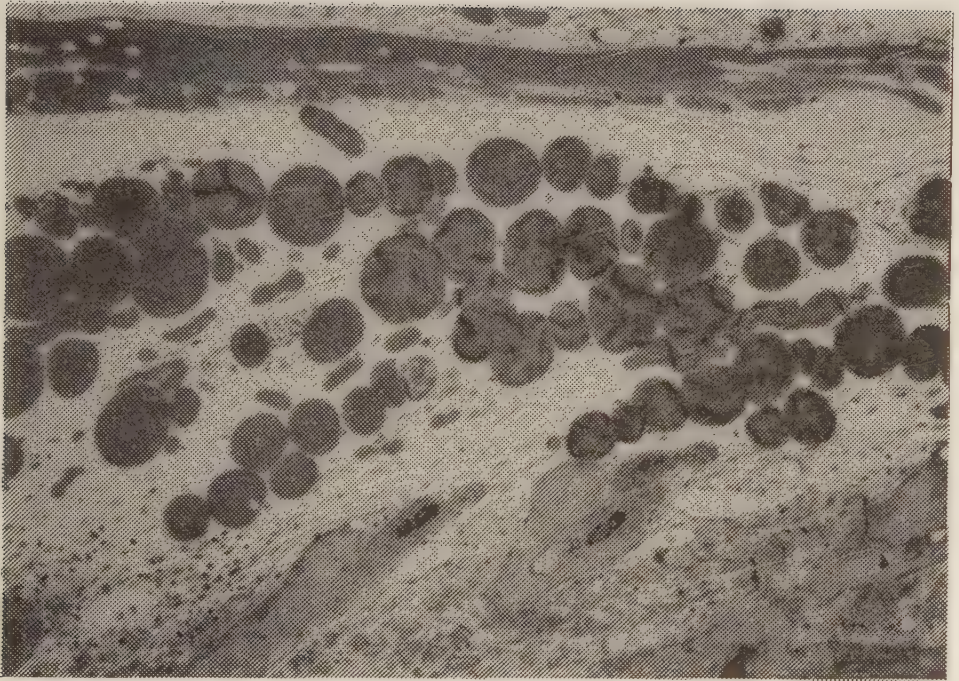
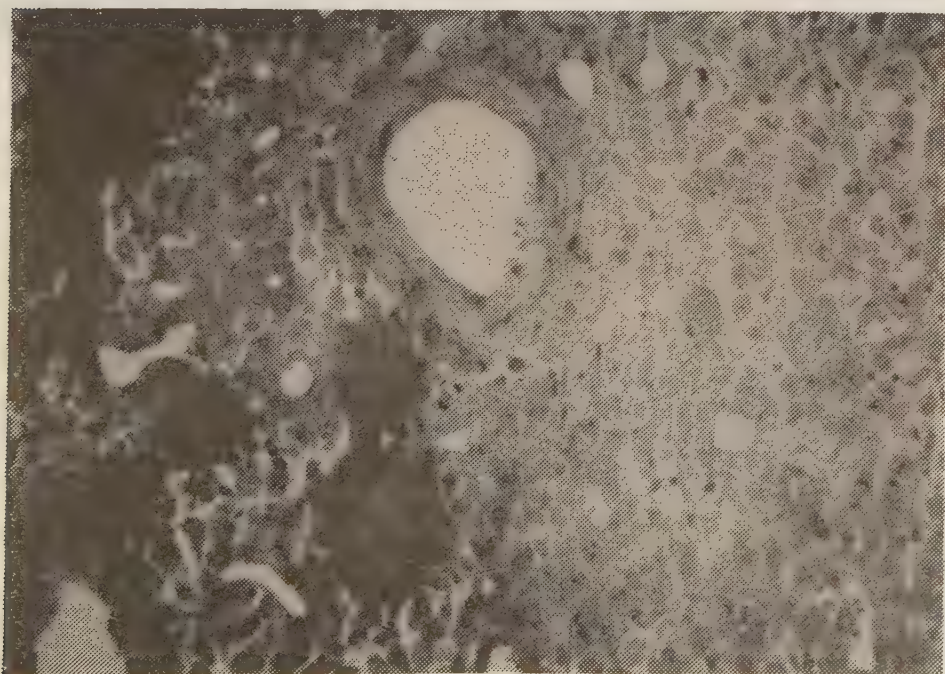
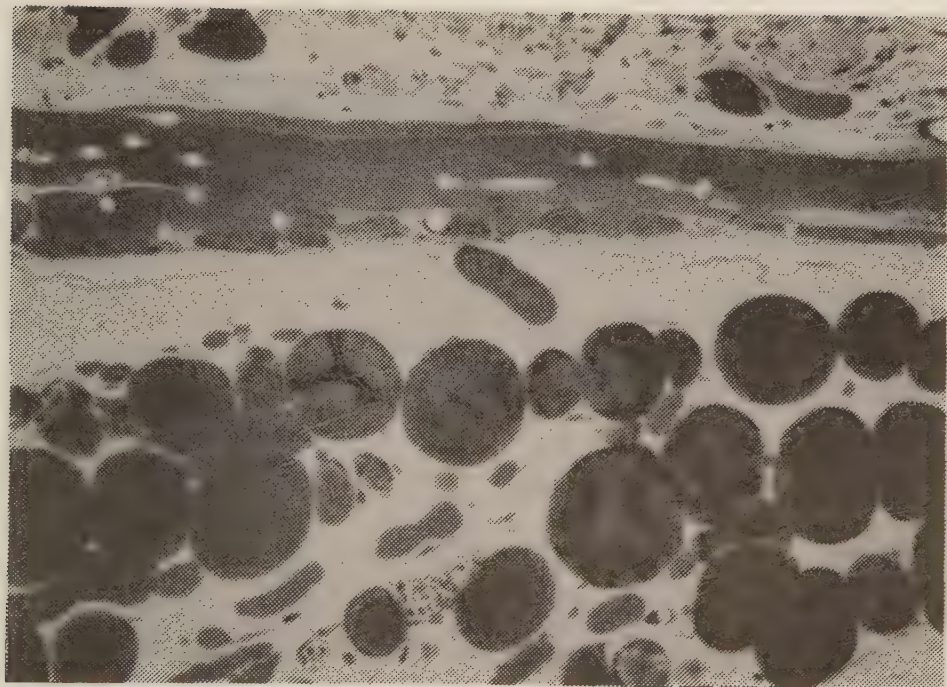


Abbildung 48:

Semidünnschnitt durch eine Kammerpräparation 72 Stunden nach Kammerimplantation. Der Vergleich zur Abbildung 31 zeigt, welche unterschiedliche Dicke die Kammerpräparationen aufweisen können. Färbung: Methylenblau-Azur II; Gesamtvergrößerung 50-fach

Abbildung 49a/b:

Semidünnschnitt durch eine Normalpräparation (a) und durch eine Kammerpräparation mit amelanotischem Hamstermelanom A-Mel-3 (b). Die Kontrollpräparation stammt vom Tag 3, die Tumorpräparation vom Tag 7. In der Tumorkammer zeigt sich ein Schwund der Muskelfasern; es sind nur noch vereinzelt Fettzellen erkennbar. Der Tumor ist bereits bis in die Subcutis durchgewachsen. Dem großen Gefäß in der Tumorkammer entspricht die elektronenmikroskopische Abbildung 56, sowie die Vergrößerung in der folgenden Abbildung 50. Färbung Methylenblau-Azur II; Gesamtvergrößerung 63-fach.



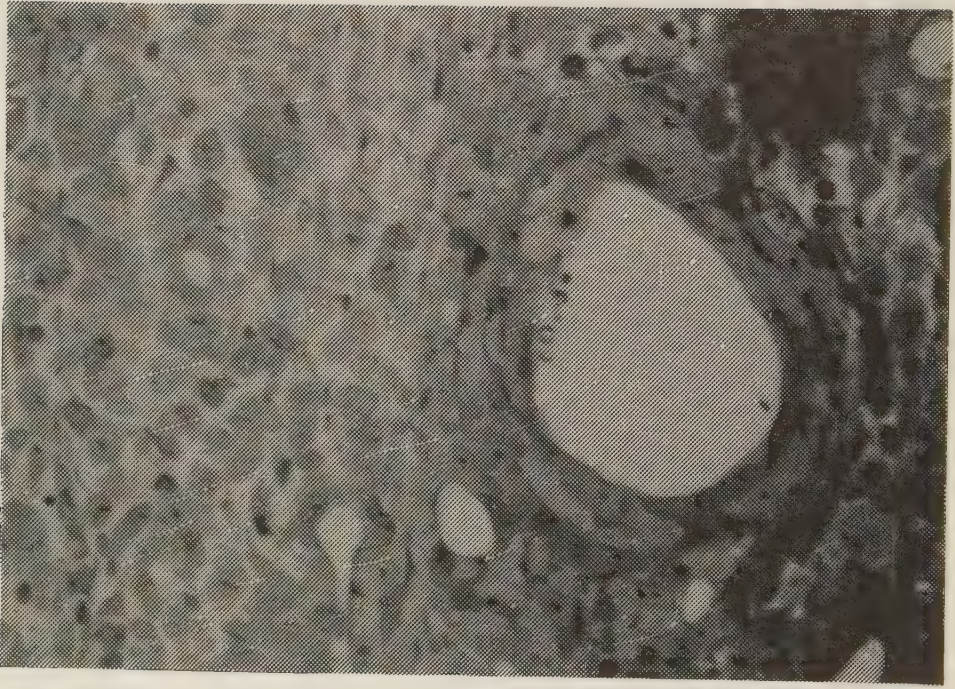


Abbildung 50:

Histologische Aufnahme vom Tag 7 nach Tumorzellimplantation. Im Zentrum ist das weitlumige Gefäß aus Abbildung 49b. Die Abbildung zeigt, daß ein Endothel nicht erkennbar ist. Aus derartigen Abbildungen sind die in älteren Literaturstellen häufig zu findenden Behauptungen entstanden, daß Tumorzellen die Gefäßlumina oft direkt begrenzen. Färbung: Methylenblau-Azur II; Vergrößerung 100-fach

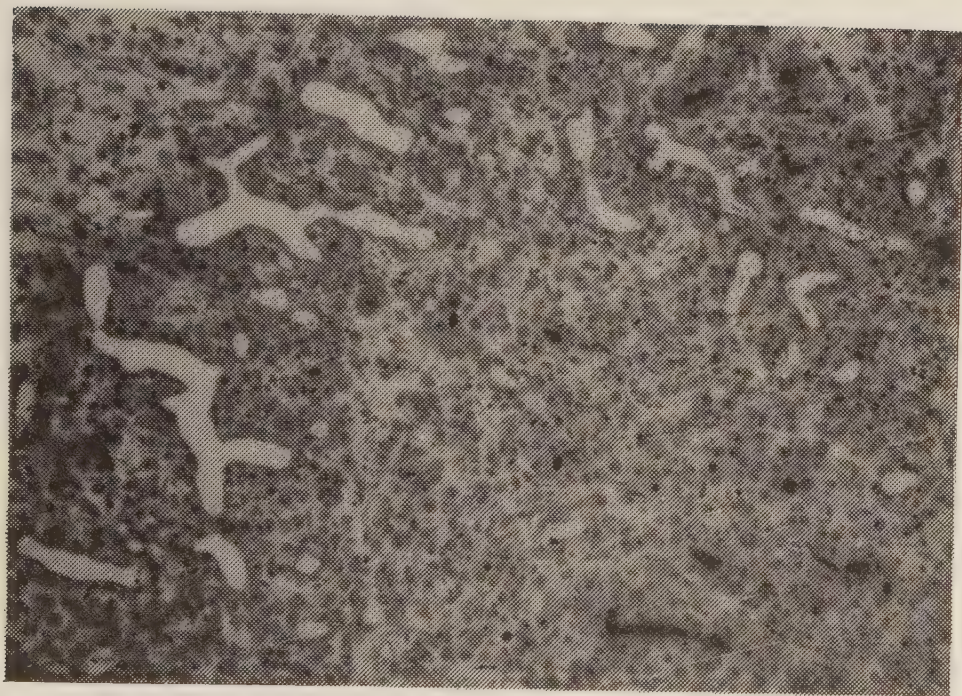


Abbildung 51:

Amelanotisches Hamstermelanom vom Tag 7. In diesem Flachschnitt (Schnittführung parallel zum aufliegenden Plexiglas) zeigen sich die lakunenartigen weiten Gefäße im Tumorgewebe. Färbung: Methylenblau-Azur II; Gesamtvergrößerung 50-fach.

Wirtsgefäßsystem stellen sich in dieser Abbildung nicht mehr dar.

Im folgenden soll nun näher auf die Morphologie, d.h. insbesondere auf den Wandbau des Tumorgefäßsystems und des Gefäßsystems der Normalgewebspräparationen eingegangen werden. Wie aus der Kapillare in Abbildung 52 und der quergeschnittenen Venole in Abbildung 53 hervorgeht, finden wir in der Kammerpräparation der Syrischen Goldhamster Endothelzellen von Kapillaren des geschlossenen Typs. Die Zellfugen zwischen den benachbarten Endothelien sind geschlossen und erscheinen als verdickte Verzahnung, bzw. als eng ineinandergreifende Fugen. Im Bereich des Zellkerns ist das Zellinventar mit den Zellorganellen, wie z.B. endoplasmatisches Reticulum, Ribosomen und Mitochondrien zu sehen. Diese Zellorganellen erscheinen intakt. Dies ist als weiteres Zeichen für die Intaktheit der chronischen Mikrozirkulationspräparation zu werten. Dies geht auch aus der elektronenmikroskopischen Aufnahme der kleinen Venole in Abbildung 54 hervor. Die Zellmembran zeigt zur Basalmembran hin eine glatte Abgrenzung. Der Durchmesser des Kapillarendothels liegt zwischen 0,05 und 1 μ m.

Demgegenüber zeigen die Sproßbildungen zum Zeitpunkt des frühen Tumorstadiums häufig Endothelzellen mit einem auffallend höherem Anteil an endoplasmatischem Reticulum, Golgi-Feldern und Mitochondrien, wie der Abbildung 53 zu entnehmen ist. Die Sprosse, die sich z.T. zwischen die Tumorzellen hineinschieben, weisen häufig nur eine kleine Spaltbildung auf. Der hohe Anteil an Zellorganellen steht im übrigen im Gegensatz zu einer traumainduzierten, beispielsweise postoperativen, Neovaskularisation. Z.T. finden sich in den Zisternen des endoplasmatischen Reticulums Viruspartikel, wie sie auch in Tumorzellen des virusinduzierten amelanotischen Hamstermelanoms A-Mel-3 zu sehen sind. Dies mag als Hinweis gedeutet werden, daß Tumorzellen an der Neoangiogenese beteiligt sein könnten. Im Gegensatz zu den Endothelfugen des Normalgewebes erscheinen die Fugen der Sproßbildungen eher glatt und langgestreckt aneinandergelegt und weisen einen meist senkrechten oder schrägen Verlauf zur abluminalen Seite hin auf. Diese geringe Differenzierung der interendothelialen "Appositionen" war in sämtlichen Stadien des Tumorstadiums zu beobachten. In den frühen Sproßbildungen

wurden von HAMMERSEN und Mitarbeitern niemals Endothellücken festgestellt (Hammersen et al., 1983).

Wie in Abbildung 56 dargestellt, unterscheidet sich der Gefäßwandbau der ausdifferenzierten Tumorgefäße von den frühen Sproßbildungen durch eine starke Abflachung des Endothels. Die Tumorgefäße zeigten einen kapillaren Wandbau. Am Endothel lassen sich keine weiteren Differenzierungen in den Zellorganellen erkennen. Im Gegensatz zu den Endothelsprossen im Frühstadium des Tumorwachstums finden sich im Endothel der ausdifferenzierten Tumorgefäße breite Lücken, die mitunter den Durchtritt von Erythrozyten durch die Gefäßwand ermöglichen (Abbildung 55). Dabei zeigt sich, daß diese breiten Risse im Gefäßendothelwall nicht eine Lückenbildung im Bereich der Endothelfugen darstellt, denn direkt in unmittelbarer Nähe dieser Endothelrisse sind bisweilen noch intakte interendotheliale Fugen vorzufinden. Darüberhinaus zeigt sich mitunter im Bereich intakter Endothelfugen bei gleichzeitiger extremer Verminderung der Höhe des Kapillarendothels ein teilweiser Verlust der Basalmembran. Die Ansammlung des elektronendichten und feinflockigen Materials, wie sie in Abbildung 55 zu sehen ist, legt die Vermutung nahe, daß möglicherweise die Basalmembran eine Schranke für eine Passage von Makromolekülen darstellen könnte. Dem widersprechen jedoch die Befunde der gesteigerten Permeabilität für Makromoleküle.

Die in den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen beobachteten Thrombozytenaggregationen weisen auf Reparationsmechanismen im Bereich dieser Endothelzellrisse des Tumorgefäßsystems hin. Bei weiterer starker Abflachung des Endothels zeigte sich zum Teil, daß das Endothel zwischen den Tumorzellen zu finden ist und z.T. Tumorzellen direkt Anschluß an das Gefäßsystem haben. Dies unterstützt wiederum die Annahme, daß Tumorzellen möglicherweise direkt an der Angiogenese beteiligt sein könnten.

Abschließend ist zu diesen Befunden zu bemerken, daß das Tumorgefäßsystem als eigenständige Gefäßeinheit zu betrachten ist. In seiner Grobstruktur ist es kapillärer Natur. Eine Einteilung in präkapilläre und postkapilläre Gefäße kann deshalb nur anhand der Funktion, d.h. der ver- und entsorgenden Aufgaben erfolgen.

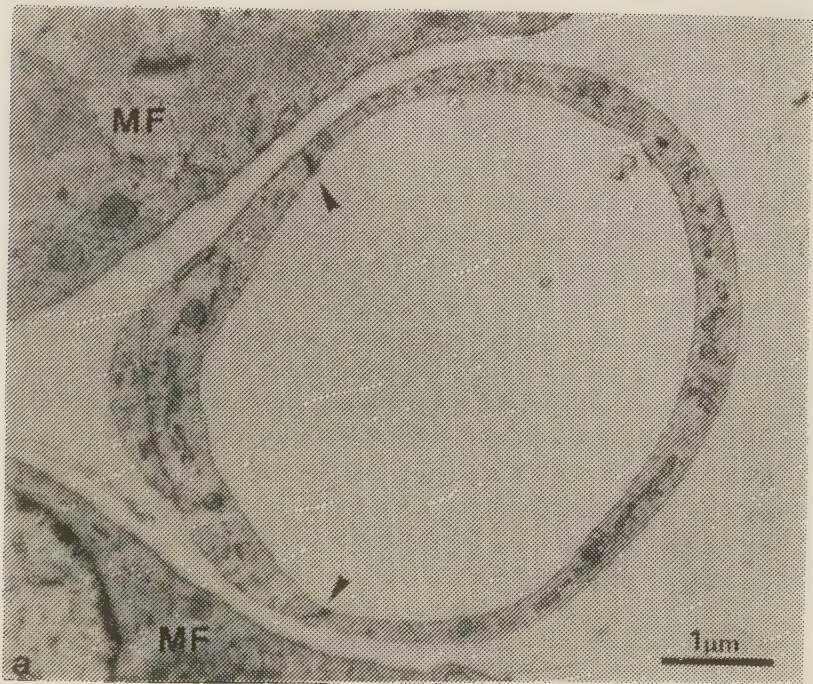


Abbildung 52:

Elektronenmikroskopische Aufnahme einer quergeschnittenen Kapillare zwischen zwei Skelettmuskelfasern (MF) des Hautmuskelschlauchs einer Hautkammer 72 Stunden nach deren Implantation (normale Kontrolle). Die endothelialen Zellfugen (►) sind geschlossen und das Zellinventar erscheint unverändert. Gesamtvergrößerung 22.000-fach.

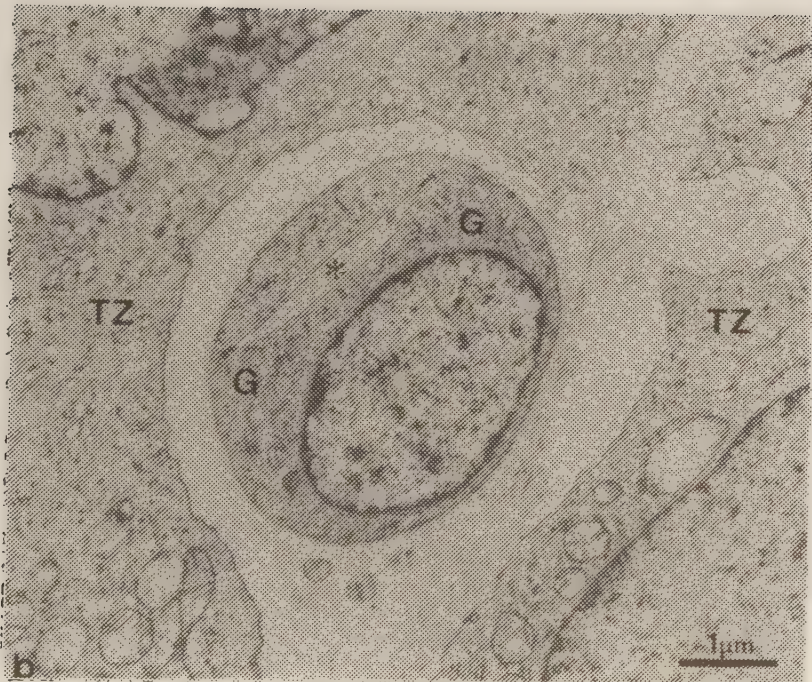


Abbildung 53:

Elektronenmikroskopische Aufnahme eines querschnittenen Kapillarsprosses zwischen zwei Tumorzellen (TZ). Das Lumen (*) ist nur ein schmaler Spalt, und das Endothel ist reich an Organellen, wie an zwei Golgifeldern (G) erkennbar (7 Tage nach Tumorimplantation). Gesamtvergrößerung 19.500-fach.

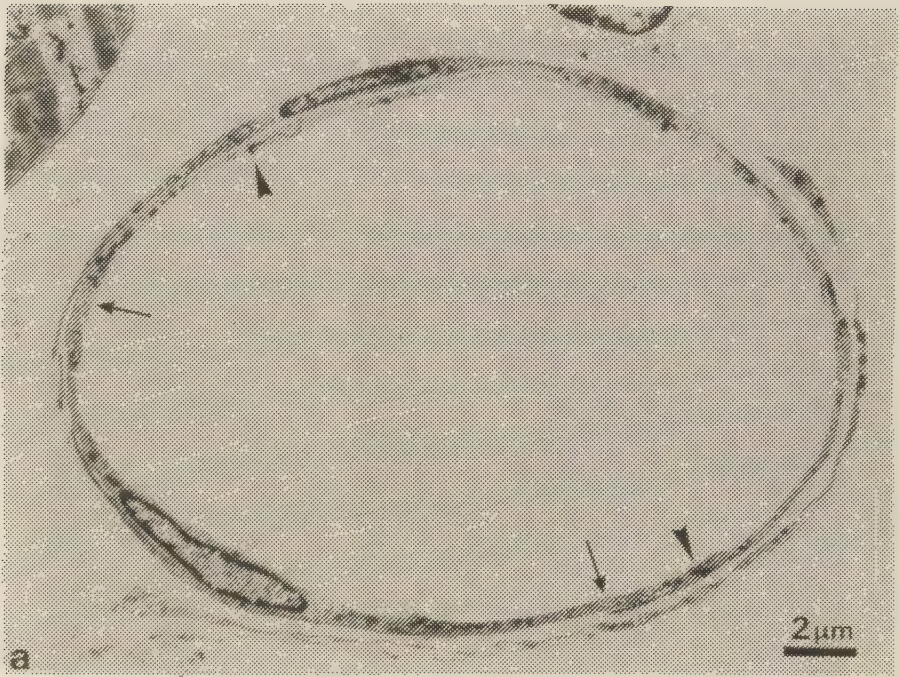


Abbildung 54:

Elektronenmikroskopische Aufnahme einer normalen, partiell muskularisierten kleinsten Vene aus einer Hautkammer 72 Stunden nach deren Implantation. Alle Fugen ($\blacktriangleright$) sind geschlossen und die kleinen Gruppen von Vesikeln und einzelnen Vakuolen ($\rightarrow$) sind noch im Bereich der Norm. Gesamtvergrößerung 6.500-fach.

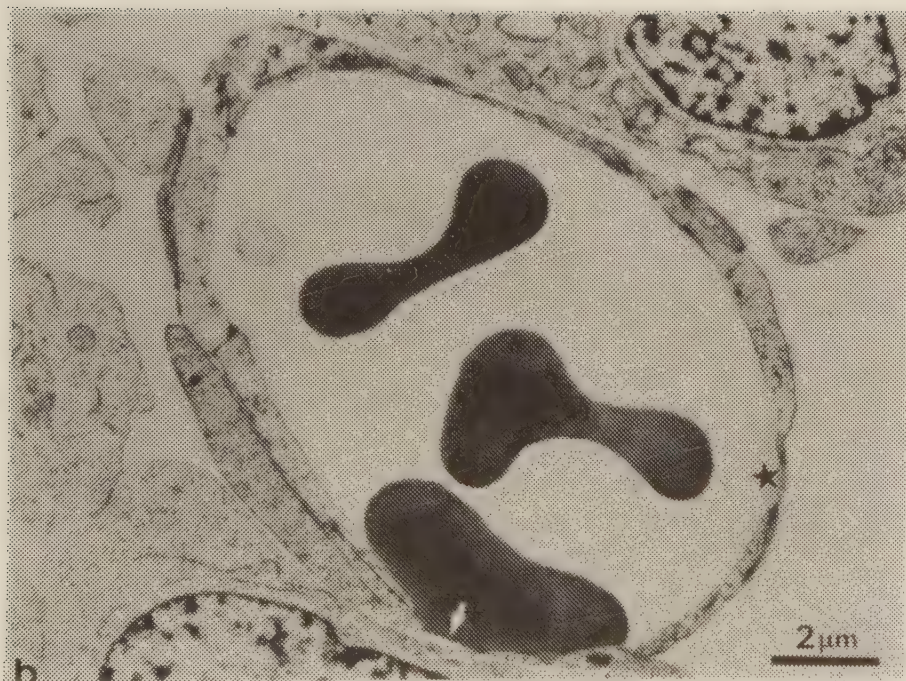


Abbildung 55:

Elektronenmikroskopische Aufnahme eines querschnittenen Tumorgefäßes mit mehreren Endothellücken. In diesen staut sich trotz der Breite des Defektes makromolekularer Gefäßinhalt zumindest passager an (★) oder Teile von Erythrozyten sind fest in diese Lücken eingepreßt (→). Gesamtvergrößerung 9.500-fach.

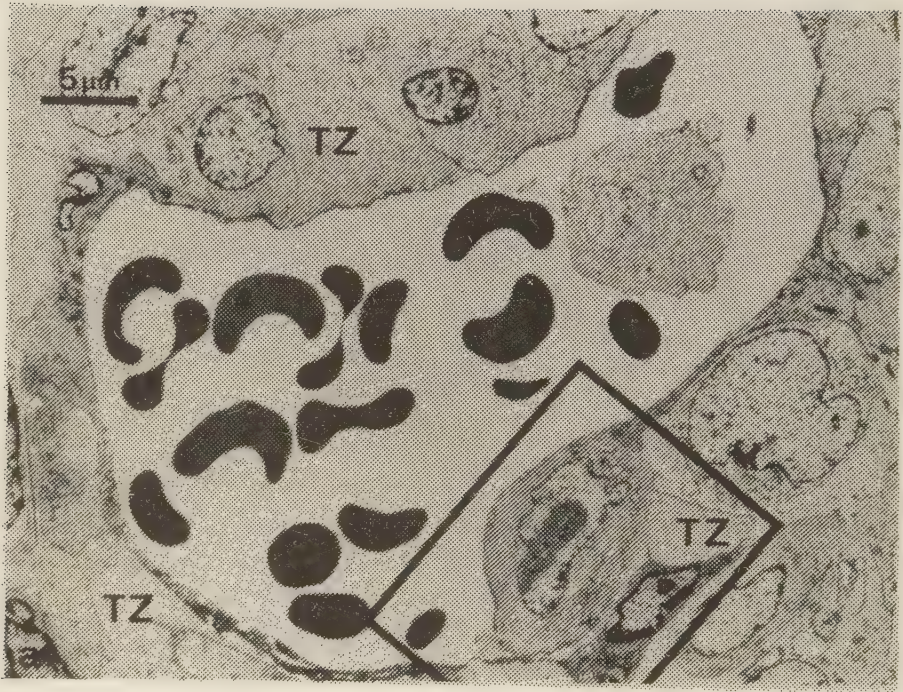


Abbildung 56:

Elektronenmikroskopische Aufnahme eines sehr weiträumigen sinusoidalen Tumorgefäßes (8 Tage nach Implantation), dessen Endothel bei dieser schwachen Vergrößerung über lange Strecken kaum erkennbar ist. Das Gefäß hat rein kapillaren Wandbau und ist vollständig von eng zusammengedrängten Tumorzellen (TZ) ummauert. Gesamtvergrößerung 3.500-fach.

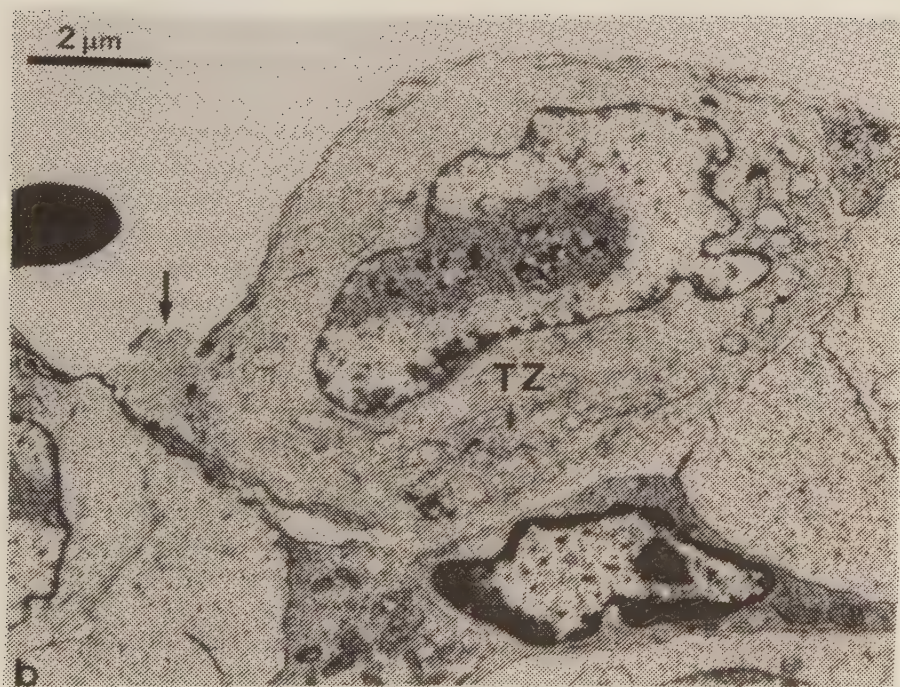


Abbildung 57:

Der in der Übersicht markierte Wandsektor bei höherer Auflösung. Erst jetzt läßt sich das sehr dünne Endothel eindeutig von einer ihm unmittelbar anliegenden Tumorzelle (TZ) unterscheiden, die mit einem stark zerklüfteten Fortsatz (➤) die Endothelbarriere durchbricht. Gesamtvergrößerung 11.000-fach.

5. Anreicherung von Fluorochromen in Tumor- und Normalgewebe

An 5 tumortragenden Tieren wurde der Antransport von Hämatoporphyrin-Derivat (HpD) und von Natrium-Fluoreszein überprüft.

Hämatoporphyrinderivat: Über den Meßzeitraum von 6 Stunden wurde die Anreicherung der fluoreszierenden Komponente des HpD über die gesamte Kammerpräparation hinweg erfaßt, d.h. im Tumor- und im umliegenden Normalgewebe. Die Meßzeitpunkte lagen bei 15, 30 und 45 Minuten, sowie bei 1, 2, 3, 4, 5 und 6 Stunden. Es wurden jeweils 64 Bilder im Bildspeicher akkumuliert und der Hintergrund, d.h. das gespeicherte Bild, das vor HpD-Gabe aufgenommen worden war, von diesem neuen akkumulierten Digitalbild subtrahiert. Zeigte sich eine Fluoreszenz, d.h. Grauwerte im Videobild, so hatte eine Anreicherung der fluoreszierenden Substanz stattgefunden. Vor Meßbeginn wurden definierte Areale im tumorumliegenden Gewebe und im Tumor quantitativ ausgewertet, indem die Grauwerte pro Pixel ausgezählt wurden. Beim Vergleich der Anreicherung der Fluoreszenz im Tumor und im tumorumliegenden Gewebe zeigte sich, daß sich HpD in beiden Gewebearealen über den Beobachtungszeitraum von 6 Stunden anreichert, jedoch zwischen der dritten bis fünften Stunde stärker im Tumor als im tumorumliegenden Gewebe. Das Ausmaß der Fluoreszenzintensität in den einzelnen Tumoren und in den einzelnen tumorumliegenden Geweben variierte hierbei von Tier zu Tier. Das maximale Verhältnis der HpD-Fluoreszenz zugunsten des Tumorgewebes lag zwischen der dritten und fünften Stunde bei 1,5 bis 4.

Von allen Tieren wurde 24 Stunden später erneut die Fluoreszenz im Bildspeicher aufgenommen und die Bilder wiederum analysiert. Dabei zeigte sich in 2 Fällen eine Umkehr der Ratio zugunsten des tumorumliegenden Gewebes. In den drei weiteren Präparationen wurde eine höhere Konzentration im Tumor gemessen. Die absoluten Verhältnisse der Fluoreszenzintensitäten konnten zu diesem Zeitpunkt jeweils nicht mehr gebildet werden, da die Hintergrundfluoreszenz nicht mehr subtrahiert werden konnte. Ursache hierfür war, daß durch die vorhandene HpD-Anreicherung eine veränderte Hintergrundfluoreszenz vorlag, und die Kammerareale nicht exakt in die Position des vorhergehenden Tages gebracht werden konnten.

Na⁺-Fluoreszein: Der Antransport dieser Substanz wurde über einen Zeitraum von 1 Stunde verfolgt. Es wurde hierbei ebenso vorgegangen wie bei Hämatorporphyrinderivat. Die Meßzeitpunkte lagen bei 1, 5, 10, 15, 30 und 60 Min. Das Maximum der Anreicherung im Tumor lag zwischen der ersten und achten Minute. Danach fand ein stetiger Abfall der Fluoreszeinkonzentration im Tumor statt.

Demgegenüber lag das Maximum der Anreicherung der Na⁺-Fluoreszein-Fluoreszenz im tumorumliegenden Gewebe etwas verzögert zwischen der fünften bis zehnten Minute. Bei Bildung der Ratios zeigte sich, daß initial eine höhere Konzentration im Tumor vorlag, mit einer Ratio bis zu 2 zwischen der 1. und 5. Minute. Zu späteren Meßzeitpunkten lag die Konzentration im Tumor unter der des tumorumliegenden Gewebes und das maximale Verhältnis von Tumor zu umliegendem Gewebe betrug 1:7 in einer der gemessenen Präparationen. In allen weiteren betrug sie 1:3 bis 1:2.

Aufgrund dieses gegensätzlichen Verhaltens der beiden fluoreszierenden Substanzen wurde überprüft, ob sich dieses gegensätzliche Verhalten nicht zu einer selektiven Tumordarstellung nützen läßt.

5.1 Selektive Tumordarstellung durch Doppelindikatortechnik und digitale Bildsubtraktion - ein neues diagnostisches Prinzip?

Hypothese: Zeigen 2 Substanzen, die mit einem bildgebenden Verfahren darstellbar sind, ein unterschiedliches Verhalten in ihrer Anreicherung im Tumor und im tumorumliegenden Gewebe, so kann dies zu einer selektiven Darstellung des Tumors verwendet werden. Weitere Voraussetzung ist jedoch, daß die beiden Substanzen selektiv erfaßbar sein müssen, z.B. anhand unterschiedlicher Emissionsspektren. Das Vorgehen ist dann wie folgt: Die Substanzen werden gleichzeitig oder in unterschiedlichen Abständen injiziert. Ist das Verhalten für diese Substanzen für bestimmte Tumoren und für ihr umliegendes Gewebe bekannt, so sollte der Zeitpunkt zur selektiven Darstellung des Tumors dem Zeitintervall entsprechen, bei dem die Fluorochrome maximal entgegengesetztes Anreicherungsverhalten zeigen. - Dies war im vor-

liegenden Fall mit der Anreicherung von Hämatoporphyrinderivat und Na^+ -Fluoreszein gegeben. - Mit Hilfe eines Bildverarbeitungssystems können dann die Grauwerte im Tumorgewebe oder im tumorumliegenden Gewebe einander angeglichen werden und die digitalisierten Bilder voneinander subtrahiert werden. Damit wird vom quantitativen Standpunkt aus gesehen eine infinite und selektive Tumordarstellung möglich.

Das Vorgehen ist schematisch in Abbildung 58 wiedergegeben. In diesem Falle wurden die Fluoreszenzintensitätswerte im umliegenden Gewebe für die Na^+ -Fluoreszein- und HpD-Fluoreszenzintensität aneinander equilibriert, d.h. einander angeglichen. Dies kann durch eine Nachbearbeitung der digitalisierten Bilder geschehen, oder wie im vorliegenden Fall, durch eine erneute Aufnahme und durch eine Variation der akkumulierten Bildsequenz im Bildspeicher. Im vorliegenden Fall mußte die Bildakkumulation für HpD um ein Viertel erhöht werden um die Fluoreszenzintensitäten im tumorumliegenden Gewebe einander anzugleichen. Nach Bildsubtraktion war eine selektive Darstellung des Tumoreals gegeben.

Dieses methodische Vorgehen funktioniert jedoch auch bei einem gleichsinnigen Verhalten von zwei Substanzen. Jedoch muß sich die Ratio vom Tumor zum umliegenden Gewebe nur um einen geringen Prozentsatz unterscheiden. Ein derartiges Beispiel ist in den folgenden Abbildungen gegeben.

Abbildung 59 zeigt die Fluoreszenzintensität des HpD 24 Stunden nach intravenöser Applikation. Das zentrale Areal kennzeichnet das gesamte Kammerpräparationsareal. Am Rande ist der Sprengring innerhalb dieser Präparationen noch als dunkler Schatten zu erkennen. Die blaue Farbe zeigt eine niedrige, gelb und weiß die höchste Fluoreszenzintensität an. 24 Stunden nach HpD-Injektion lag das Verhältnis der Fluoreszenzintensität Tumor zu tumorumliegenden Gewebe bei 1:1. Der Tumor befindet sich im oberen linken Abschnitt der Abbildung. Die höchste Konzentration an HpD liegt im Tumorrandbereich, d.h. in der Ödemzone. Dies spricht dafür, daß das Hämatoporphyrinderivat über diesen Zeitraum aus dem Interstitium in die Ödemzone abtransportiert wurde.

Abbildung 60 zeigt die identische Präparation 30 Minuten nach Na^+ -Fluoreszeininjektion. Es zeigte sich, daß im Tumorzentrum eine wesentlich geringere Konzentration an Na^+ -Fluoreszein vorliegt als im tumorumliegenden Gewebe. Die höchste Fluoreszenzintensität (weiß) war wiederum in der Ödemzone zu beobachten. Die Fluoreszenzintensitäten der Grünfluoreszenz und der Rotfluoreszenz des tumorumliegenden Gewebes wurden dadurch aneinander angeglichen, indem ein Bereich im tumorumliegenden Gewebe, der sich zwischen den beiden Enden des Sprengringes befindet, aufeinander normiert wurden. Dies heißt, in diesem Bereich waren die Fluoreszenzintensitäten zu dem Zeitpunkt der beiden Aufnahmen, die hier vorliegen, bereits aneinander angeglichen. Bei nachfolgender digitaler Bildsubtraktion des Na^+ -Fluoreszein-Bildes vom Hämatoporphyrinderivat-Bild, d.h. Na^+ -Fluoreszein minus HpD, stellt sich nur noch der Tumor im Kammerareal dar.

Dies ist in der folgenden Abbildung 61 wiedergegeben. Der Tumor ist nun nur noch als heller Fleck im Kammerbereich sichtbar. Das korrespondierende Tumorbild im Durchlicht, das mit einem Photomakroskop aufgenommen wurde, zeigt Abbildung 62.

Es wurde mit diesem Vorgehen eine Möglichkeit aufgezeigt den Antransport von fluoreszierenden Substanzen in Tumor gegenüber dem umliegenden Normalgewebe zu untersuchen und zu quantifizieren. Dies kann als Beispiel für einen Antransport von Chemotherapeutika angesehen werden.

Die Kombination von Tumormodell und digitaler Bildverarbeitung bietet damit die Möglichkeit, die Anreicherung von Chemotherapeutika direkt zu überprüfen, wenn die Pharmaka an fluoreszierende Substanzen gekoppelt werden können, oder selbst fluorochrome Eigenschaften besitzen.

Weiterhin wurde eine neue Möglichkeit aufgezeigt, die für eine Diagnose von Tumoren von Bedeutung sein kann. Das methodische Vorgehen ließe sich z.B. in der Radiologie verwirklichen bzw., auf dieselbe Art wie sie hier dargestellt wurde, zur Diagnostik von oberflächlichen Tumoren mittels Endoskopie oder durch Mikroskopie, sofern die Organoberflächen auch zugänglich sind.

SELEKTIVE TUMORDARSTELLUNG DURCH DOPPELINDIKATORECHNIK
UND DIGITALE BILDSUBTRAKTION

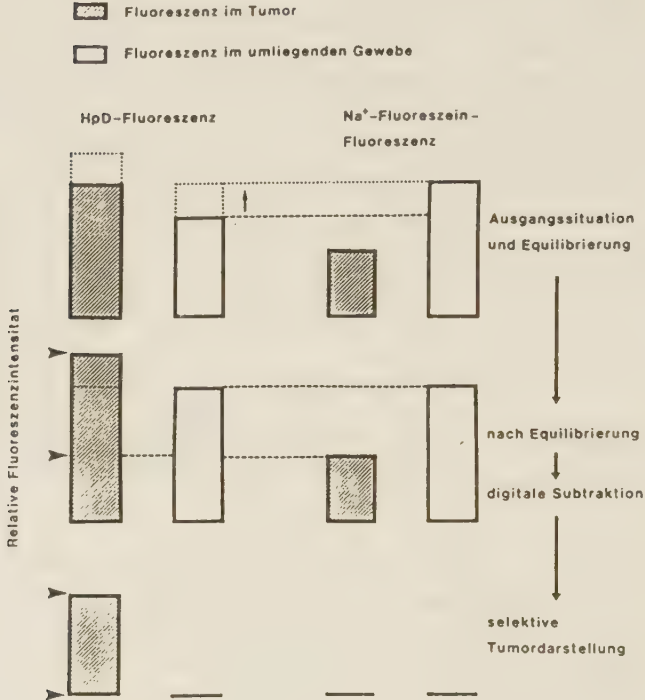


Abbildung 58:

Vorgehensweise zur selektiven Tumordarstellung mit Hilfe zweier fluoreszierender Substanzen und digitaler Bildsubtraktion: Zwei durch Bildverarbeitungssysteme zu erfassende Indikatoren mit unterschiedlichem Emissionsspektrum und jeweils unterschiedlichem Anreicherungsverhalten im Tumor gegenüber dem umliegenden Gewebe werden systemisch verabreicht. Für beide Substanzen liegt eine unterschiedliche "ratio" von Tumor- vs umliegendem Normalgewebe vor. Die anhand von Grauwerten quantitativ zu erfassenden Fluoreszenzintensitäten im tumorumliegenden Gewebe werden einander angeglichen. Durch nachfolgende Bildsubtraktion erfolgt eine infinite und selektive Darstellung des Tumorgewebes.

Abbildung 59:

Falschfarbendarstellung der Fluoreszenzintensität von Hämatoporphyrin-Derivat (HpD) in einer Kammerpräparation 8 Tage nach Tumorzellimplantation. Blau zeigt die niedrigste Fluoreszenzintensität an, gelb die höchste. Die Aufnahme erfolgte 24 Stunden nach HpD-Injektion. Der Tumor stellt sich am oberen linken Rand zwischen 10 und 12 Uhr dar und reicht bis in die Mitte der Kammerpräparation. Das grüne Areal um den Tumor kennzeichnet das Tumorrandödem. Offensichtlich wurde das Hämatoporphyrin über den interstiellen Raum in das Tumorrandödem abtransportiert. Die "ratio" Tumor- zu umliegendem Gewebe ist 1:1.

Abbildung 60:

Falschfarbendarstellung derselben Kammerpräparation 30 Minuten nach Na^+ -Fluorescein-Injektion. Der Tumor zeichnet sich als blaues Areal am oberen linken Bildrand ab und reicht bis in das Zentrum der Kammerpräparation. Blau gibt erneut die geringste Fluoreszenzintensität an, weiß die höchste. Die höchste Konzentration der fluoreszierenden Anteile des Fluoresceins stellt sich im Tumorrandödem dar. Die "ratio" Tumor- zu umliegendem Gewebe beträgt 1:3.

Abbildung 61:

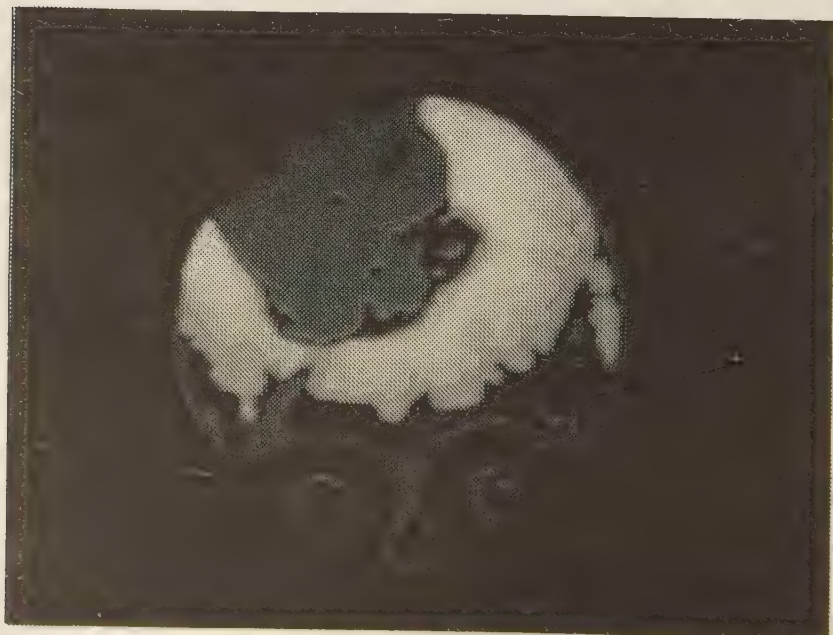
Selektive Falschfarbendarstellung des Tumorareals nach digitaler Subtraktion der Abbildungen 59 - 60, d.h. $\text{HpD(Rotfluoreszenz)} - \text{minus } \text{Na}^+ \text{-Fluorescein-Fluoreszenzintensität}$. (Grünfluoreszenz). Es stellt sich selektiv das Tumorareal dar. Jedoch können daraus keine Rückschlüsse über die Konzentration der beiden Fluoreszenzmarker getroffen werden. Der Tumor wird infinit und selektiv dargestellt.

Abbildung 62:

Photomakroskopische Durchlichtaufnahme der Kammerpräparation, die für diese Untersuchungen verwendet wurde. Wie deutlich sichtbar, korreliert das Tumoreal mit der selektiven Darstellung in Falschfarben in Abbildung 61.



Abbildung 59:



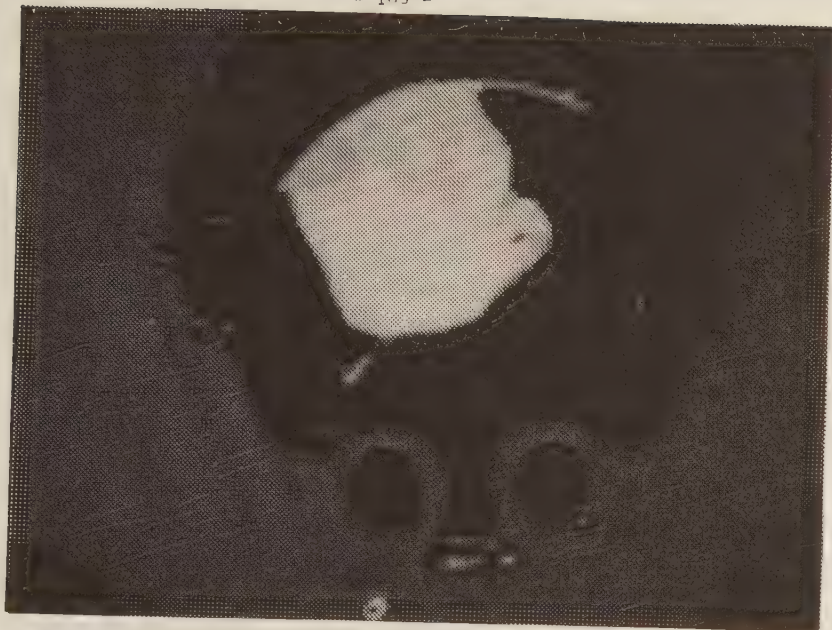


Abbildung 61:

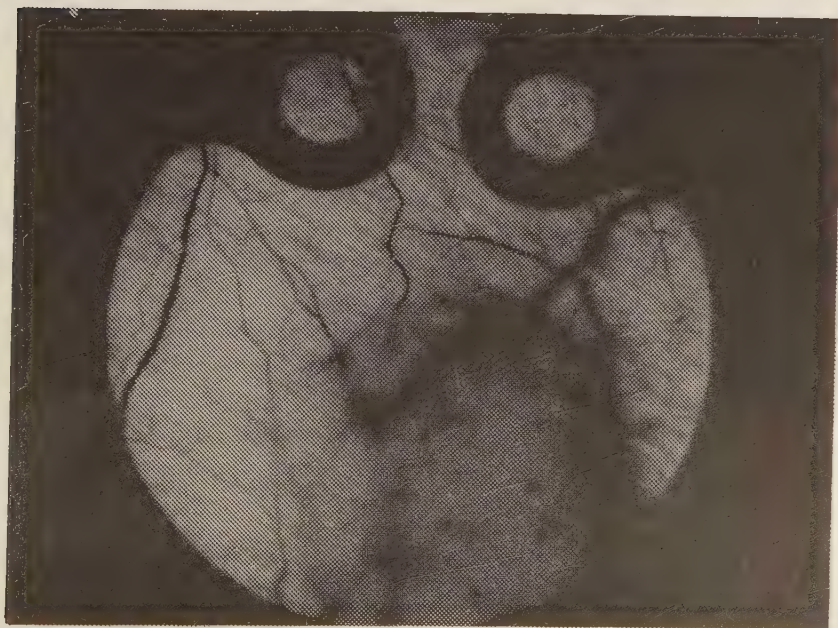


Abbildung 62:

IV. DISKUSSION

1. Methodik

Mit der Einführung neuer quantitativer intravitalmikroskopischer Methoden zur Analyse der Mikrozirkulation (Johnson, 1967; Johnson und Wayland, 1967; Wayland und Johnson, 1967; Intaglietta et al., 1970; Intaglietta und Tompkins, 1971; Intaglietta und Tompkins, 1972a; Arfors et al., 1975) und deren Kombination mit Videotechniken (Intaglietta und Tompkins, 1972b, 1973; Arfors et al., 1975; Intaglietta et al., 1975) wurde es Mitte der 70er Jahre erstmals möglich eine detaillierte Analyse der Mikrohämodynamik durchzuführen. Es konnten die Blutfließgeschwindigkeit, der Gefäßdurchmesser und der intravasale Druck in einzelnen Mikrogefäßen direkt gemessen werden, sowie der segmentale Volumenfluß, der segmentale Gefäßwiderstand und weitere abgeleitete Größen für die terminale Strombahn verschiedener Organe berechnet werden. Dies beinhaltete die Möglichkeit die Regulation der Mikrozirkulation an einzelnen mikrovaskulären Gefäßsegmenten zu untersuchen.

Bis zu diesem Zeitpunkt war es mit den zur Verfügung stehenden Methoden meist nur möglich größere Teilbereiche eines Organs oder die einzelnen Organe in ihrer Gesamtheit zu erfassen. Mit den neuen Methoden war man den integralen Durchblutungsmeßverfahren, wie etwa der Mikrosphären-Technik (Rudolph und Heymann, 1967; Heymann et al., 1977), der Krypton-58- und Xenon-153-Auswaschtechnik (Linder, 1966), der Rubidium-86- und Radiojod-Antipyrin-Verteilungsmethode nach Sapirstein (Sapirstein, 1958; Sapirstein und Moses, 1964) etc. überlegen. Man war damit nicht nur in der Lage einzelne Gefäße zu erfassen, sondern es wurde auch möglich, durch kontinuierliche Messungen dynamische Veränderungen in den Gefäßbetten zu verfolgen. Aufgrund dieser Fortschritte und wegen erster vielversprechender Anwendungen der Methoden zur direkten Erfassung der Mikrohämodynamik von Tumoren (Intaglietta et al., 1977; Reinhold et al., 1977; Endrich et al., 1979a, 1979b, 1979c) war es naheliegend, diese Techniken zur quantitativen Erfassung der Mikrozirkulation im Frühstadium des Tumorwachstums einzusetzen.

Die charakteristischen Eigenschaften dieses Gefäßsystems sind kaum untersucht, obwohl ihm wegen seiner Funktion als Antransportweg für Chemotherapeutika besondere Aufmerksamkeit entgegenbracht werden sollte. Für die Anwendung der genannten Systeme sprach weiterhin, daß damit zusätzlich eine quantitative morphometrische Analyse möglich war (Underwood, 1970; Schmid-Schönbein, et al., 1977). Im Gegensatz zu einer alleinigen Messung von Gefäßdurchmesser, Blutzellgeschwindigkeit, Erythrozytenfluß und segmentalem Volumenfluß, erlaubte dies die Erfassung der gesamten hämodynamischen Situation eines Gefäßnetzwerkes. Dies beinhaltete die Berechnung weiterer physiologisch relevanter Parameter, wie etwa der Kapillardichte pro Gewebeseinheit, der funktionellen Kapillardichte, d.h. der Gefäßdichte erythrozytenperfundierter Kapillaren, sowie der Kapillaroberfläche und des regionalen Blutflusses (Schmid-Schönbein, et al., 1977).

Mit der Einführung der Fluoreszenzmikroskopie wurden zusätzlich Untersuchungen zur Permeabilität von Makromolekülen (Olsson, et al., 1975; Hultström und Svensjö, 1977; Svensjö, et al., 1977, 1978, 1979; Hultström, 1982) möglich und durch die Anwendung der Gewebe-Oberflächen- pO_2 -Messung die Erfassung der regionalen Gewebssauerstoffversorgung (Kessler und Lübbers, 1966; Kessler und Grunewald, 1969; Lübbers, 1969, 1973; Kessler, 1973; Kessler et al., 1976; Lund, 1979; Nylander et al., 1983; Kessler et al., 1986).

Durch die in dieser Weise bisher noch nicht durchgeführte Kombination aller hier genannten Methoden und der Einbeziehung von elektronenmikroskopischen und histologischen Untersuchungen war es schließlich möglich, eine umfassende Analyse der Mikro-zirkulation des Hautmuskels, d.h. des Wirtsgewebes und der Tumormikro-zirkulation, sowie der Mikro-zirkulation des tumorumliegenden Gewebes durchzuführen. Vor der Diskussion der Besonderheiten dieser Gefäßregionen werden zunächst diese methodischen Aspekte der vorliegenden Arbeit näher beleuchtet.

1.1. Quantitative Videomikroskopie

Die methodischen Grundlagen der Videomikroskopie und der Technik der Messung der Blutzellgeschwindigkeit mit Hilfe der Zwei-Schlitz- und der Zwei-Fenster-Methode, sowie der Bestimmung der Gefäßdurchmesser mit der Bildschermethode wurden im methodischen Teil dieser Arbeit (siehe 9.) beschrieben. Es wurde dort bereits eine Wertung der verwendeten Geschwindigkeitsmeßmethoden (siehe 9.6.3.1.7) vorgenommen. Im folgenden Abschnitt wird deshalb nur noch dann auf Besonderheiten im Bereich der Mikroskopie eingegangen, soweit sie für die Erfassung der einzelnen Parameter im Rahmen dieser Arbeit von Bedeutung waren.

1.1.1. Videofluoreszenzmikroskopie

Einen zentralen Punkt bei der Mikroskopie bildet das Auflösungsvermögen des Mikroskops. Dieses wird im wesentlichen durch folgende Faktoren bestimmt. Durch die Wellenlänge des verwendeten Auf- oder Durchlichtes, durch die numerische Apertur der verwendeten Linsen im Objektiv, durch die Aberration der einzelnen Linsen, den Kontrast des darzustellenden Objektes und durch die Art der Beleuchtung (Smith, 1966; Wayland, 1975).

Es wurden Objektive mit möglichst hohen numerischen Aperturen verwendet, da dadurch ein Höchstmaß an Lichtquantum das Linsensystem des Objektivs passieren kann und die Beleuchtungsintensität von Fluoreszenzstoffen reduziert werden kann. Durch diese Anordnung können damit Nebenwirkungen, die aufgrund einer zu starken Beleuchtung der Fluoreszenzmarker zu erwarten sind, minimiert werden (Herrmann, 1983).

Bei Verwendung von weißem Licht wird dieses aufgrund von chromatischer Aberration, bzw. sphärischer Aberration in seine Spektrallinien zerlegt, wobei, wie bekannt, kurzwelliges (blaues) Licht stärker und langwelliges geringer gebrochen wird. Dadurch können möglicherweise Unschärfen in der Abbildung entstehen.

Chromatische und sphärische Aberration sind durch die Linsenanordnung je-

doch weitgehend eliminiert. Sie kann durch die Verwendung von monochromatischem Laserlicht nahezu völlig ausgeschlossen werden. Da in der Mehrzahl der Versuche die Fluoreszenzmikroskopie (Grünfluoreszenz oder Rotfluoreszenz) Anwendung fand, wurde innerhalb eines relativ engen Wellenlängenbereichs angeregt, d.h. zwischen 450 - 490 nm, bzw. 355 - 425 nm. Diese Beleuchtungsanordnung trug dazu bei, die genannten Aberrationsfehler weitestgehend zu vermeiden.

Der Kontrast der darzustellenden Gefäßregionen war im wesentlichen beeinflusst durch die Qualität der Präparation, durch die Eigenschaften des Mikroskops und durch das Auflösungsvermögen der verwendeten Videotechniken. Optimaler Kontrast im Präparationsareal wurde u.a. dadurch erzielt, daß Präparationen, die ein Ödem aufwiesen, aufgrund der genannten Ausschlusskriterien eliminiert werden mußten. Die Besonderheiten des Auflösungsvermögens des Mikroskops wurden soeben und im Abschnitt Methodik dargestellt und sind derzeit im fluoreszenzmikroskopischen Bereich als optimal zu bewerten.

Die Videoeinrichtungen waren so aufeinander abgestimmt, daß das Auflösungsvermögen der Kamera gut zu dem des Videorecorders paßte, und keine Einbußen hinsichtlich der Lichtempfindlichkeit hingenommen werden mußten. Es wurde deshalb eine Videokamera verwendet, die einerseits die relativ hohe Empfindlichkeit von 10^{-5} Lux besaß, andererseits aber in ihrem Auflösungsvermögen (600 x 400 Linien) an das des Videorecorders adaptiert war. Videokameras mit einer höheren Lichtempfindlichkeit und geringerem Auflösungsvermögen hätten "Rauschen" im Videobild erzeugt, und die exakte Bestimmung der Gefäßdurchmesser erschwert.

In nahezu allen Untersuchungen wurde mit Fluoreszenzauflicht gearbeitet, lediglich zur Geschwindigkeitsmessung bei Geschwindigkeiten oberhalb von 2,5 mm/sec mußte Durchlicht verwendet werden. Für die Durchmesserbestimmung dieser Gefäße wurde jedoch ebenfalls mit Fluoreszenzauflicht mikroskopiert, um systematische Fehler beim Vergleich der verschiedenen Gefäßsegmente zu vermeiden. Die Schwarz-Weiß-Kamera, die zur Positionierung der Photodiode nötig war, wurde hierzu innerhalb weniger Sekunden gegen die hochauflösende und fluoreszenzempfindliche Restlichtkamera ausgewechselt.

1.1.2. Geschwindigkeitsmessung

Das methodische Vorgehen, sowie die Vor- und Nachteile der beiden verwendeten Meßmethoden, der Zwei-Schlitz-Methode (Asano et al., 1964; Wayland und Johnson, 1967; Wayland, 1973; Arfors et al., 1975) und der Zwei-Fenster-Technik (Silverman et al., 1972; Intaglietta et al., 1975; Butti et al., 1975) wurden in 9.6.3.1. der Methodik ausführlich beschrieben.

Gegenüber der Photodiodenmessung, die nur on-line erfolgen konnte und nur für Geschwindigkeiten oberhalb von 2,5 mm/sec verwendet wurde, konnten mit Hilfe der Zwei-Fenster-Technik beliebig viele Messungen in dem auf Videoband gespeicherten Areal durchgeführt werden. Nach bisherigen Darstellungen in der Literatur war diese Methode der Zwei-Fenster-Technik nur für Messungen im Kapillargebiet geeignet (Intaglietta et al., 1975; Holliger et al., 1975; Butti et al., 1975). Von all diesen Autoren wurden jedoch ausschließlich Durchlichtpräparationen verwendet und zur Darstellung des Gefäßsystems, sowie zur Geschwindigkeitsmessung nur mit Schwarz-Weiß-Video-technik gearbeitet. Nach eigenen Erfahrungen mit anderen Mikrozirkulationspräparationen, wie z.B. dem Mesenterium oder der Hamsterbackentasche sind sogar bei diesen dünnen Gewebsschichten, die eine optimale Darstellung der Mikrogefäße erlauben, nur geringe Kontrastunterschiede im Blutfluß der Gefäße außerhalb des Kapillarbereichs zu erwarten.

In der vorliegenden Präparation wurde Fluoreszenzmikroskopie verwendet. Aufgrund dieses Vorgehens wurden damit auch in Gefäßen bis zu einem Gefäßdurchmesser von 25 μ m ausreichende Lichtmodulationen durch die vorbeifließenden korpuskulären Bestandteile des Blutes erzielt. Das Plasma leuchtete hierbei als heller Strom und die korpuskulären Bestandteile erschienen als dunkle Punkte in diesen Gefäßen. Die Lichtmodulationen waren ausreichend, um Messungen der Gefäßgeschwindigkeit erstmals auch in Gefäßen außerhalb des Kapillargebietes mit Hilfe der Zwei-Fenster-Technik durchzuführen.

Um sicherzustellen, daß hier keine Artefakte vorlagen, wurden die ersten 50 Messungen in jeweils identischen Gefäßsegmenten abwechselnd mit der Photodiode bei Durchlichtbeleuchtung und Messungen mit der Zwei-Fenster-Technik

bei Fluoreszenz-Auflichtbeleuchtung durchgeführt. Der Korrelationskoeffizient für diese Messungen lag bei $r = 0,94$. Es wurden hierbei venoläre und arterioläre Gefäßsegmente gemessen, ohne jedoch wesentliche Unterschiede festzustellen. Aufgrund dieser positiven Meßergebnisse war gesichert, daß mit diesem Vorgehen keine Meßfehler produziert wurden. Damit war auch für Gefäßregionen außerhalb der Kapillaren der Vorteil gegeben, daß aufgenommene Videosequenzen mehrfach off-line reanalysiert werden konnten. Lag jedoch die Fließgeschwindigkeit oberhalb von 2,5 mm/sec, wurden die Messungen mit der Photodiode durchgeführt.

Abschließend bleibt noch anzumerken, daß die Verwendung der Zwei-Fenster-Technik für Gefäßregionen außerhalb des Kapillarbettes eine wichtige Erweiterung des Meßspektrums zur Geschwindigkeitsmessung und damit zur Bestimmung des Volumenflusses in den Gefäßsegmenten der Mikrozirkulation darstellt.

1.1.3. Gefäßdurchmesser

Für die Bestimmung des Gefäßdurchmessers ist generell das Auflösungsvermögen des Mikroskops und des Videosystems von entscheidender Bedeutung (Johnson, 1967). Diese Voraussetzung gilt sowohl für die "image-splitting-" (Baez, 1966) als auch für die "image-shearing-"Methode (Intaglietta und Tompkins, 1973)

Den Anforderungen an das Auflösungsvermögen wurde mit dem Aufbau des Mikrozirkulationsmeßplatzes weitestgehend Rechnung getragen (siehe 1.1.1.). Mit dem verwendeten Videomikroskop und der Bildscher-Technik (Intaglietta und Tompkins, 1973) konnte der Gefäßdurchmesser mit einer Genauigkeit von 0,8 μm erfaßt werden. Dies wurde anhand der Berechnung des Variationskoeffizienten ermittelt. Bei einem Variationskoeffizienten von 38 % und einem Durchmesser des Gefäßes von 100 μm betrug die Standardabweichung 0,38 μm . Um mit Sicherheit zwei Punkte voneinander differenzieren zu können, mußten zwei Punkte mindestens zwei Standardabweichungen, d.h. 0,76 μm , voneinander entfernt sein. Damit konnten in dem verwendeten System die Gefäßdurchmesser mit einem Auflösungsvermögen von 0,8 μm gemessen werden. Dies entsprach

weitestgehend den Werten, die in der Literatur bei Verwendung der Fluoreszenzmikroskopie angegeben werden (Sarelius und Duling, 1982).

Auf die Bestimmung der abgeleiteten Größe des Volumenflusses wurde im Teil der Methodik bereits näher eingegangen. Wie dort bereits dargestellt, wurde ein möglicher systematischer Fehler bei der Bestimmung des Volumenflusses in den Kapillaren bewußt in Kauf genommen, da sich dadurch die Aussage und die Interpretation der Daten im wesentlichen nicht ändern.

1.2. Quantifizierung des Mikrohämatokrites

Die Sauerstoffversorgung wird im Bereich der Mikrozirkulation vor allem vom kapillären Blutfluß, vom Sauerstoffgehalt des Hämoglobins und von der Kapillardichte bestimmt. Letztere war bisher Gegenstand intensiver Untersuchungen und wird im folgenden Abschnitt näher diskutiert werden. Demgegenüber lagen kaum direkte Messungen des segmentalen Mikrohämatokrites vor. Die direkte Erfassung würde eine Aussage über den Flux an Erythrozyten im Bereich der Mikrozirkulation erlauben und damit über den effektiven Sauerstofftransport in den einzelnen Gefäßen.

Bisher wurde der Mikrohämatokrit durch Zellzählung in einem Mikrogefäß mit bekanntem Volumen bestimmt (Cokelet, 1974; Gorczynski et al., 1978). Dies galt nur für den Kapillarbereich. Stromabwärts und stromaufwärts des Kapillarnetzwerkes konnte der Mikrohämatokrit jedoch nur durch die Messung der optischen Dichte bestimmt werden (Jendrucko und Lee, 1973; Lipowsky et al., 1980; Pries et al., 1981). Der Hauptnachteil dieser Methoden bestand darin, daß in-vitro Messungen auf die in-vivo Situation kalibriert werden mußten. Die Zuverlässigkeit dieser Methode über ein breites Gefäßspektrum konnte bisher noch nicht gezeigt werden.

Es wurde deshalb in der vorliegenden Arbeit die von SARELIUS und DULING beschriebenen Methodik mit Hilfe von fluoreszierenden Erythrozyten verwendet (Sarelius und Duling, 1982). Der Markierungsvorgang war an dem von ZIMMERHACKL et al. beschriebenen Vorgehen orientiert und wurde zur Verbesserung des Markierungsgrades der einzelnen Erythrozyten nach dem in der

Methodik beschriebenen Vorgehen modifiziert (Zimmerhackl et al., 1983). Die hier verwendete Methode ermöglichte neben der direkten Erfassung des Mikrohämatokrites auch die direkte Messung der Blutzellgeschwindigkeit auf einfache Weise, d.h. ohne die Notwendigkeit spezieller optischer Detektoren und einer vorherigen in-vitro Kalibration dieser Systeme, wie sie in dem Abschnitt "Geschwindigkeitsmessung" in 9.6.3. der Methodik beschrieben wurden. Zusätzlich erlaubte diese Methode die direkte Bestimmung des Flusses an Erythrozyten, der damit nicht aus der Erfassung des optischen Hämatokrites und des Volumenflusses berechnet werden mußte (Lipowsky et al., 1980). Darüberhinaus kann die Transitzeit von Erythrozyten über das Kapillarsystem hinweg direkt gemessen werden (Sarelius und Duling, 1982; Sarelius, 1986). Bestimmungen der Transitzeit wurden jedoch in den vorliegenden Untersuchungen nicht durchgeführt, da die Erythrozyten im Tumorgefäßsystem nicht über die gesamte Kapillarwegstrecke verfolgt werden konnten.

Die Verwendung von fluoreszenzmarkierten Erythrozyten setzt jedoch voraus, daß die markierte Erythrozytenfraktion das Verhalten der Gesamterthrozytenpopulation widerspiegelt (Sarelius und Duling, 1982; Zimmerhackl et al., 1983, Berger et al., 1985). In den vorliegenden Versuchen wurde die markierte Erythrozytenfraktion erstmals nach 30 Minuten, sowie nach einer Stunde und nach zwei Stunden gemessen. In diesem Zeitraum blieb die markierte Erythrozytenfraktion konstant. Dies stimmte mit den bisher in der Literatur beschriebenen Befunden überein (Sarelius und Duling, 1982; Berger et al., 1985). Es wurde ebenso davon ausgegangen, daß nur die Erythrozyten rezirkulierten, die durch den Markierungsvorgang nicht geschädigt worden waren. Es ist bekannt, daß die Blutgewinnung, die Markierung und die Waschvorgänge Schädigungen an der Erythrozytenmembran zu erzeugen vermögen. Derartig geschädigte Zellen scheinen während der ersten Rezirkulationsphasen aus dem Kreislauf eliminiert zu werden. Für diese Annahme sprechen die Befunde aus der eigenen Arbeitsgruppe (Berger et al., 1985). Wir konnten zeigen, daß eine Verformbarkeit der markierten Erythrozyten in vitro mit der Rezirkulation in vivo korreliert. Erythrozyten, die unmittelbar nach Markierung injiziert wurden, zeigten ein konstantes Rezirkulationsverhalten und rezirkulierten zu nahezu 100 %. Bei Erythrozyten, die am zweiten, drit-

ten und vierten Tag nach Markierung verwendet wurden, fiel die Rezirkulationsquote am Tag 3 auf 10 % ab. Dies war gleichzeitig mit einer Verminderung der Verformbarkeit um 50 % verknüpft.

Die Verformbarkeit der markierten Erythrozyten wurde *in vitro* mittels eines Kegel-Platte-Rheoskops gemessen, und die Elongation als Maß der Verformbarkeit bestimmt. Es wurde auch darauf hingewiesen, daß die reduzierte Elongation der markierten Erythrozytenpopulation nicht eine verminderte Verformbarkeit aller Erythrozyten anzeigten. Wie die einzelnen photographischen Aufnahmen belegten, war dieser Mittelwert vielmehr dadurch bedingt, daß nur einzelne markierte Zellen nicht verformbar waren. Aufgrund dieser Befunde und einer erniedrigten Rezirkulation auf 75 % innerhalb von 30 - 45 min. nach Injektion wurde rückgeschlossen, daß nur Erythrozyten mit rheologischem Normalverhalten rezirkulierten. Darüberhinaus konnte durch eine zusätzliche Chrom 51-Markierung der FITC-Erythrozyten gezeigt werden, daß für die Elimination dieser markierten roten Blutzellen insbesondere Leber und Milz verantwortlich waren (Berger et al., 1985). Diese Befunde und das Ergebnis einer konstant rezirkulierenden Anzahl an Erythrozyten zwischen der 30. und 120. Minute in den vorliegenden Versuchen sprechen dafür, daß nur rheologisch unbeeinträchtigte Erythrozyten im Kreislauf rezirkulieren. In Ergänzung hierzu darf darauf hingewiesen werden, daß die gleichzeitige Registrierung des arteriellen und des zentralvenösen Druckes keine signifikanten Änderungen zeigte.

Für die Bestimmung des Mikrohämatokrites und des Erythrozytenfluxes ist von Bedeutung, daß in dem beobachteten Gefäß auch alle Zellen erfaßt werden. Der kritische Gefäßdurchmesser wurde von SARELIUS und DULING mit 55 μm angegeben (Sarelius und Duling, 1982). Dieser Meßwert konnte jedoch nicht ohne erneute Überprüfung auf diese Untersuchungen übertragen werden. Es wurden deshalb Messungen an Verzweigungsstellen von Gefäßen durchgeführt und kontrolliert, ob die identische Anzahl an markierten Erythrozyten auch in den Tochtergefäßen nachzuweisen war. Es konnte gezeigt werden, daß alle Zellen im versorgenden Gefäß vor der Aufzweigung erfaßt worden waren. Dies ist u.a. damit zu begründen, daß nur Gefäße mit einem Durchmesser von weniger als 25 μm in diese Messungen einbezogen wurden. In größeren Gefäßen

wurde deshalb nicht gemessen, da mit der relativ hohen markierten Erythrozytenfraktion von 2% gearbeitet wurde. Bei diesem hohen Anteil an markierten Erythrozyten konnten deshalb nur kleine Gefäße untersucht werden, da in Gefäßen mit einem Durchmesser von mehr als 25 μ m eine Überlagerung von markierten Erythrozyten im Videobild zu beobachten war. Daraus hätten falsch niedrige Ergebnisse im Erythrozytenflux und im Mikrohämatokrit resultiert. Für die Bestimmung des Mikrohämatokrites ist von Bedeutung, daß die markierte Erythrozytenfraktion und die markierten Zellen in vivo hinreichend präzise erfaßt werden können. SARELIUS und MCKINLAY konnten zeigen (Sarelius und McKinlay, 1985), daß die Messung an einem Gefäßquerschnitt gegenüber einer Messung über eine Gefäßstrecke hinweg zu bevorzugen ist, da diese präziser ist und über einen erweiterten Erfassungsbereich der Zählung der markierten Erythrozyten in vivo und der markierten Erythrozytenfraktion gearbeitet werden kann.

In den Untersuchungen der obengenannten Autoren wurde ein Durchflußzytometer verwendet, um die markierte Erythrozytenfraktion ex vivo zu bestimmen. In der vorliegenden Arbeit wurde die Kombination zweier Verdünnungsverfahren gewählt und die Gesamterythrozytenpopulation bzw. die markierte Erythrozytenfraktion gezählt. Die durch die jeweilige Verdünnung möglicherweise auftretenden Fehler wurden durch eine verlängerte Auszählung der markierten Erythrozyten in den Gefäßsegmenten kompensiert. Es wurden in vivo mindestens 100 markierte Zellen gezählt. Hierzu waren z.T. Zeiträume über mehrere Minuten nötig. Bei Verwendung eines Durchflußzytometers, das inzwischen auch am Institut für Chirurgische Forschung etabliert ist, kann diese Zählzeit für eine markierte Erythrozytenfraktion von 0,005 auf eine Sekunde reduziert werden, um innerhalb eines Variationskoeffizienten von 10 % zu bleiben. Bei einer Zählzeit von 1 Sekunde und einer markierten Erythrozytenfraktion von 1 % würde ein Variationskoeffizient von 1 % resultieren (Sarelius und McKinlay, 1985). Zur Verbesserung der Präzision und aus Gründen der Zeitersparnis bedarf es demnach zur Bestimmung der markierten Erythrozytenfraktion der Verwendung eines Durchflußzytometers (Sweeney und Sarelius, 1986).

1.3. Berechnung der Kapillardichte

Neben dem Mikrohämatokrit ist die Kapillardichte einer der entscheidenden Parameter für die Gewebesauerstoffversorgung. Veränderungen der funktionellen Kapillardichte ermöglichen eine lokale Variation der Sauerstoffaustauschoberfläche und damit der Ratio Kapillar- zu Zelldiffusionsstrecken, d.h. von einer Kapillare müssen mehr oder weniger Zellen im perikapillären Raum versorgt werden. Durch die Veränderung dieser Größe kann eine stabile Oxygenierung auch des kapillären pO_2 aufrechterhalten werden. Dies entspricht auch der Vorstellung vom KROGH'schen Zylinder (Krogh, 1919, 1922). Es lagen bisher umfangreiche Untersuchungen zur Kapillardichte und zur Bedeutung der Gefäßantwort bei verändertem Sauerstoffbedarf vor. Dies galt insbesondere für den Skelettmuskel (Burton und Johnson, 1972; Johnson et al., 1976; Renkin et al., 1981, Lindbom et al., 1980, 1982, 1984).

Zur Bestimmung der Kapillardichte wurden stereologische Prinzipien verwendet (Underwood, 1970; Schmid-Schoenbein et al., 1977). ELIAS und WEIBEL definierten die Stereologie als dreidimensionale Interpretation von zweidimensionalen Bildern. Damit bedeutet die Stereologie eine Extrapolation vom zwei- in den dreidimensionalen Raum (Elias und Weibel, 1967).

In der vorliegenden Arbeit wurde die von SCHMID-SCHOENBEIN et al. beschriebene Methode verwendet (Schmid-Schoenbein et al., 1977). Diese Methode der Bestimmung der Kapillardichte hat den Nachteil des hohen Zeitaufwands. Dies wird jedoch durch die hohe Genauigkeit und Zuverlässigkeit dieses Vorgehens kompensiert. Die als Kapillardichte bezeichnete Größe ist, streng genommen, eine Gesamtkapillarlänge pro Gewebefläche. Deshalb wird auch die Benennung in mm/mm^2 angegeben. Die abgeleitete Größe der Kapillaroberfläche kann schließlich auch in eine Gewebeoberfläche pro Gramm Gewebe umgerechnet werden, wenn ein spezifisches Gewicht des Gewebes von $1,28 \text{ g/cm}^3$ zugrunde gelegt wird (Jamaki et al., 1976). Es könnte ebenso auch ein Volumenfluß pro Gramm Gewebe berechnet werden. Ein derartiges Vorgehen ist jedoch aufgrund der Variation der Blutfließgeschwindigkeiten mit Vorsicht zu bewerten. Es wurde deshalb auch auf diese Darstellung in den Ergebnissen verzichtet.

1.4. Erfassung der makromolekularen Permeabilität

Die von WITTE eingeführte Methodik der Fluoreszenzmikroskopie zur Überprüfung der Kapillarpermeabilität hat inzwischen eine breite Anwendung im Bereich der Mikrozirkulation gefunden (Witte, 1957; Olsson et al., 1975; Hultström und Svensjö, 1977; Svensjö et al., 1977, 1978, 1979; Björk et al., 1982; Endrich et al., 1982c; Hultström, 1982; Ley und Arfors, 1982; Björk und Smedegard, 1984; Gahm et al., 1984; Nugent und Jain, 1984; Ley et al., 1984; Wahl et al., 1985; Gerlowski und Jain, 1986; Ley und Arfors, 1986). Mit diesen Methoden war es jedoch nicht möglich den Auswärtsstrom von bestimmten Molekülgrößen in das Interstitium exakt zu quantifizieren. Es konnten jedoch Aussagen darüber gemacht werden, ob die Endothelschranke in den Gefäßbereichen verschiedener Gewebeareale für verschiedene Molekülgrößen intakt ist, bzw. welche Unterschiede entlang der mikrovaskulären Gefäßsegmente für die einzelnen Moleküle bestehen.

Erste Grundlagen für eine exaktere Beurteilung der Permeabilität in den einzelnen Mikrogefäßen zeigte die Arbeitsgruppe um JAIN, die mit photometrischen Methoden die Geschwindigkeit des Auswärtsstroms der fluoreszierenden Moleküle erfassen konnte und daraus den Diffusionskoeffizienten berechneten (Nugent und Jain, 1984; Gerlowski und Jain, 1986). Zur Untersuchung der Permeabilität haben sich FITC-Dextrane verschiedener Molekülgrößen bewährt (Hultström, 1982).

Die verwendeten fluoreszenzmarkierten Dextrane des Molekulargewichts 150.000 bieten den Vorteil, daß sie normalerweise nicht aus dem Intravasalraum abtransportiert werden, demnach würde eine frühzeitige Extravasation einen Permeabilitätsanstieg anzeigen. Hinzu kommt, daß die Bindung von Dextranen an Plasmaproteine in-vivo zu vernachlässigen ist (Rutili und Arfors, 1976; Rutili, 1978).

FITC-Dextran 150.000 wurde deshalb in der vorliegenden Arbeit zur Überprüfung der Qualität der Präparation herangezogen, sowie zur Differenzierung des Permeabilitätsverhaltens im Tumorgefäßsystem im Vergleich zum tumorumliegenden Gewebe oder zum Wirtsgewebe, d.h. zur Hautmuskelmikrozirkulation innerhalb der Kammerpräparation. Eine exaktere Differenzierung als

die vorgegebene Stadieneinteilung war nicht möglich (siehe 9.6.3.6; Methodik). Selbst die Verwendung eines Bildsubtraktionssystems, wie es zur Überprüfung des Antransportes von Hämatoporphyrin-Derivat und Natrium-Fluoreszein herangezogen wurde (9.9. Methodik bzw. 5. Ergebnisse), ermöglichte bisher keine exakte Quantifizierung über den Auswärtstransport von bestimmten Molekülgrößen.

1.5. Messungen des Gewebeoberflächen- pO_2

Veränderungen im Gewebe- pO_2 spiegeln einen Nettoeffekt zwischen dem lokalen Sauerstoffangebot und dem lokalen Sauerstoffverbrauch wieder. Wobei das Sauerstoffangebot durch die Sauerstoffsättigung im arteriellen Blut, durch den Fluß an Erythrozyten, durch die Kapillardichte und durch die zurückzulegenden Diffusionsstrecken und natürlich durch den Verbrauch der einzelnen um die Kapillare angeordneten Zellen bestimmt wird.

Die Messung des Gewebe- pO_2 ist schwierig und die Interpretation der Ergebnisse ist noch immer mit Problemen behaftet. Die Gewebe- pO_2 -Werte können mit Hilfe von Gewebe-Kammern (Lamb, 1966; Jones et al., 1969) durch Erfassung des venösen pO_2 (Stainsby und Otis, 1964; Bond et al., 1969; Honig et al., 1971), durch Stich- oder Oberflächenelektroden (Kunze, 1966; Kessler und Lübbers, 1966; Whalen und Nair, 1967) und durch intrazelluläre Indikatoren (Millikan, 1937; Chance, 1957; Coburn und Myers, 1971) erfaßt werden. Auf die Vorteile und Nachteile der Methoden soll nicht eingegangen werden. Es darf jedoch darauf hingewiesen werden, daß mit diesen Methoden unterschiedliche Schätzungen des Gewebe- pO_2 wiedergegeben werden, da jede Methode unterschiedliche pO_2 -Werte erfaßt, die zwischen dem arteriellen Blut und einem minimalen intrazellulären pO_2 liegen. Dies erschwert die Vergleichbarkeit der Meßergebnisse.

Die Verwendung des venösen Blutes als Index des Gewebe- pO_2 gibt nur eine Schätzung der Gewebesauerstoffversorgung wieder, da darin auch ein arterio-venöser Shunt (AV-Shunt) per Diffusion oder Blutfluß enthalten sein kann. Am anderen Ende des Spektrums wird mit den Sauerstoffstichelektroden eine Reihe von "hoffentlich" randomisiert angelegten Meßpunkten erfaßt.

Diese Messungen mit Stichelektroden sind traumatisch und waren für das von uns verwendete Modell nicht zu verwenden, da nach derartigen Messungen die Präparationen sofort hätten verworfen werden müssen. Die Verwendung von intrazellulären Indikatoren des Gewebe- pO_2 erlaubt nur eine einmalige Messung. Für kontinuierliche und dynamische Veränderungen stehen diese Meßmethoden damit nicht zur Verfügung. HONIG und Mitarbeiter haben darauf hingewiesen, daß der wichtigste Aspekt in der Gewebe- pO_2 -Versorgung in der Kontrolle der kleinsten Werte in den am wenigsten gut versorgten Arealen des Gewebes liegt, da dort die Sauerstoffversorgung am ehesten limitiert sein wird und möglicherweise auch der erste Stimulus für eine Vasodilatation in Gang gesetzt wird (Honig et al., 1971).

Auch wenn diese Endstrecken der Sauerstoffversorgung mit der Gewebeoberflächen- pO_2 -Elektrode nicht erreicht werden konnten, so kam wegen der geschilderten Nachteile der anderen zur Verfügung stehenden Methode dennoch nur sie in Frage. Die Vorteile der Elektrode lagen darin, daß damit atraumatisch gearbeitet werden konnte, eine Messung über einen weiten Bereich des Gefäßnetzes ermöglicht war und sie häufig wiederverwendet werden konnte. Im übrigen konnten damit dynamische Veränderungen des Gewebesauerstoffdruckes erfaßt werden.

Die Mehrdrahtoberflächenelektrode gilt deshalb derzeit als die beste kontinuierliche und atraumatischste Methode zur Messung des Gewebe pO_2 (Nylander et al., 1983; Kessler et al., 1986). Mit der Mehrdrahtoberflächenelektrode wird zwar nicht das letzte Glied in der Kette der Sauerstoffversorgung, d.h. das Mitochondrium, erreicht, aber die Messungen spiegeln Veränderungen auf kapillärer Ebene wieder.

In die Messung des Gewebe- pO_2 mit der 8-Draht-Oberflächenelektrode über einen weiten Gewebebereich gehen im einzelnen mehrere lokale Variablen ein. U. a. ist die Kapillargeometrie, d.h. Kapillarlängen, Kapillardurchmesser und Kapillardichte, einbezogen, sowie auch dynamische Veränderungen in der Durchblutung und die Heterogenität der Durchblutung in den einzelnen Kapillarkanälen und nicht zuletzt die Hämoglobin- O_2 -Dissoziationskurve (Lübbbers, 1973, 1977; Kessler, 1973a, 1976).

Die Zusammenstellung der Meßergebnisse in sogenannte Summenhistogramme gibt

einen groben Überblick über die tägliche Gewebesauerstoffversorgung im Tumor, im tumorumliegenden Gewebe und im Normalgewebe. Die Mittelwerte der einzelnen Histogramme wurden zur statistischen Verarbeitung herangezogen. Weitere statistische Verarbeitungen, wie sie von NYLANDER et al., bzw. von LUND vorgeschlagen wurden, wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt, da daraus keine anderen Schlußfolgerungen zu erwarten gewesen wären (Lund, 1979; Nylander et al., 1983; siehe hierzu: 9.7.8. der Methodik).

Abschließend darf zur Technik der Gewebeoberflächen- pO_2 -Messung mit der Mehrrahtoberflächen-elektrode bemerkt werden, daß dies derzeit die genaueste und eine der empfindlichsten Methoden zur direkten und kontinuierlichen Beurteilung einer Gewebehypoxie darstellt. Hinzu kommt, daß es die metabolische Situation genau widerspiegelt, denn eine Korrelation von lokaler Laktatbildung mit dem Gewebeoberflächen- pO_2 zeigte einen Korrelationskoeffizienten von 0,84 (bisher unveröffentlichte Ergebnisse).

2. Das transparente Hautkammermodell - Eine physiologische Mikrozirkulationspräparation

Nach Einführung des transparenten Kammermodells am Kaninchenohr durch SANDISON wurden derartige Modelle häufig für morphologische und beschreibende mikrozirkulatorische Untersuchungen verwendet (Sandison, 1924, 1928). In der Folgezeit wurde eine Reihe von Verbesserungen der chirurgischen Technik und der Kammeranordnung publiziert. CLARK et al. verwendeten ein schwereres Material für die Basis der Kammer und setzten einen Glaspfropfen ein, um Fremdmaterial in das Kammerareal einbringen zu können (Clark et al., 1930). Das Modell von WILLIAMS beinhaltete erstmals eine abnehmbare Glasoberfläche (Williams, 1934a). Derselbe Autor stellte im gleichen Jahr noch eine Kammertechnik adaptiert an die Körperhaut vor (Williams, 1934b). ALGIRE verwendete die von WILLIAMS beschriebene Technik und implantierte die Kammer in eine Rückenhautfalte von Mäusen (Algire, 1943).

20 Jahre später berichteten SANDERS und Mitarbeiter über ein transparentes Kammermodell für die Hamsterbackentasche (Sanders, 1963; Sanders und Shubik, 1964; Goodall et al., 1965). Diese neu beschriebene Kammer bestand aus Plexiglas und war zweigeteilt. Ein Teil der Kammer wurde auf die Innenseite der Hamsterbackentasche aufgebracht, während der äußere Teil dieser Kammer die Haut und das darunter liegende Bindegewebe "ersetzte". Damit wurde eine erhebliche Verbesserung der optischen Qualität im Vergleich zur Kaninchenohrpräparation erzielt, da in diesem Falle nur ein Epithel transilluminieren mußte. Dieses Modell eignete sich hervorragend zur Untersuchung proliferierender Blutgefäße, d.h. von Gefäßen, die Neoangiogenese zeigten. YAMAURA et al. und PAPENFUSS et al. konstruierten eine neue Kammerpräparation adaptiert an die Rückenhautfalte von Ratten (Yamaura et al., 1971; Papenfuss et al., 1979). Das Modell von YAMAURA war aus Plexiglas aufgebaut, während die Kammer von PAPENFUSS eher derjenigen gleich, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde. Sie bestand ebenfalls aus Aluminium. Beide letztgenannten Modelle erlaubten das Studium von vorgeformten Gefäßen, d.h. von vorhandenen Wirtsgefäßen.

Nach SEWELL muß eine ideale Kammerpräparation anatomisch und physiologisch normal sein (Sewell, 1966). Darüberhinaus forderte er für eine optimale Präparation ein hohes optisches Auflösungsvermögen und die Möglichkeit wiederholter Messungen am identischen Gewebeareal, sowie einen direkten Zugang zum Kammerareal für die direkte Applikation von Pharmaka oder für Gewebeimplantationen (Sewell 1966).

In nahezu allen Kammermodellen mit Ausnahme der Präparationen von ALGIRE, YAMAURA und PAPENFUSS zeigte sich eine ausgeprägte Neovaskularisation (Algire, 1943; Yamaura, 1971; Papenfuss, 1979). Für zuverlässige Untersuchungen sollte das Präparationsareal jedoch weitgehend dem anatomischen und physiologischen Normbereich entsprechen, d.h. dem ortsständigen Gewebeareal, wie es vor der chirurgischen Intervention vorgefunden worden war. Neugebildete Gefäße, die aufgrund einer Wundheilung entstehen, können nicht als normal angesehen werden (Sewell, 1966).

Aus diesem Grund sind auch diejenigen Kammerpräparationen, in denen das bereits vorhandene Gewebe für Studien am mikrovaskulären Gefäßbett genutzt werden kann, am ehesten für physiologische und pharmakologische Untersuchungen geeignet. Hinzu kommt, daß das vorhandene Wirtsgewebe auch zur Untersuchung postoperativer Veränderungen geeignet ist (Clark et al., 1930).

Obwohl die beiden letztgenannten Kammern adaptiert an die Rückenhaut von Ratten diesen Bedingungen weitgehend genügten, waren die experimentellen Möglichkeiten dennoch dadurch begrenzt, daß nahezu ausschließlich Bindegewebe untersucht werden konnte.

In der transparenten Rückenhautkammer am Syrischen Goldhamster wurden der Skelettmuskel und, wie ultrastrukturell nachzuweisen war, die Mastzellen und das Gefäßendothel intakt belassen. Dies spricht dafür, daß auch das nervale System keiner Beeinträchtigung unterworfen war. Dies wird auch durch die Beobachtungen untermauert, daß durch einen Schmerzreiz am kaudalen oder kranialen Kammerrand mittels einer Nadel oder einer Pinzette eine Konstriktion der arteriolen Gefäßsegmente im Präparationsareal hervorgerufen werden konnte. Versuchstiere ohne diese Reaktion wurden vom Versuch

ausgeschlossen. Damit wurden an diesem Modell Messungen mikrohämodynamischer Parameter unter dem Einfluß der natürlich einfließenden neuronalen und humoralen Faktoren möglich.

In einer idealen Kammer sollte eine optische Klarheit mit hohem Auflösungsvermögen kombiniert sein. Dies war in der von uns etablierten Präparation trotz der belassenen Schicht an Cutis und Subcutis mit darüberliegendem Hautmuskel gegeben, da die Haut der Hamster sehr lichtdurchlässig und, im Gegensatz zur Rattenrückenhaut, leicht mobilisierbar war.

Eine weitere Forderung von SEWELL (Sewell, 1966) war die der kontinuierlichen Beobachtungsmöglichkeit des Kammerareals. Dies war in der Hamsterrückenhautkammer gegeben. Es konnten damit dynamische Veränderungen, wie eine induzierte Neoangiogenese oder eine Gefäßreaktivität kontinuierlich oder intermittierend über nahezu 4 Wochen verfolgt werden (Endrich et al., 1980). Durch Kombination mit der Videofluoreszenzmikroskopie wurden mikrohämodynamische Messungen im Gefäßnetz der Kontrollgruppe und der tumortragenden Tiere über einen Zeitraum von 14 Tagen möglich.

Um die Anzahl unkontrollierter Variablen zu minimieren, schlug SEWELL vor die Anwendung von Anästhesie während der Mikroskopie zu vermeiden oder zu reduzieren. Sowohl Inhalations- als auch Injektionsnarkotika induzieren hämodynamische Nebenwirkungen, die auch die Mikrozirkulation beeinflussen. So wird unter anderem in Abhängigkeit von der Dosierung eine Hypotension und eine periphere Vasodilatation erzeugt (Altura et al., 1980; Longnecker und Harris, 1980a, 1980b; Longnecker et al., 1982; Longnecker, 1984; Goetz et al., 1986a, 1986b). Weiterhin wurden eine durch Narkose verursachte Verminderung und Ausschaltung der spontanen arteriolen Vasomotion beschrieben, (Faber et al., 1982; Messmer et al., 1984; Funk et al., 1983a, 1983b; Intaglietta und Messmer, 1983; Colantuoni et al., 1984b), sowie auch über eine Verminderung der konstringierenden Wirkung neurohumoraler Substanzen, wie der Katecholamine, Angiotension II, Serotonin usw., berichtet (Übersicht bei Altura et al., 1980). Aufgrund dieser Veränderungen müssen die Befunde, die an narkotisierten Tieren erhoben wurden, mit Vorsicht bewertet werden. Dies gilt auch für Untersuchungen der Tumordurchblutung un-

ter Narkose (Zanelli et al., 1975; Zanelli und Fowler, 1977; Peterson, 1979). Das nicht narkotisierte und im Wachzustand auch nicht gestresste Tier ist deshalb zur Analyse und zum Vergleich physiologischer Meßdaten das geeignetere Modell.

Eine weitere Bedingung, die von SEWELL genannt wurde, war die Verminderung des chirurgisch induzierten Traumas, denn das operative und postoperative Trauma verursacht nicht nur lokale Gewebsschädigungen, sondern beeinflußt auch die Spiegel der Plasmakatecholamine und anderer lokaler Hormone (Popper et al., 1977), die einen direkten Einfluß auf die Mikrozirkulation haben. Es war deshalb selbstverständlich, daß das chirurgische Trauma weitgehend reduziert werden sollte.

Da sich die Gewebeschichten bei der hier durchgeführten Operation gut voneinander ablösen ließen, war das lokale chirurgische Trauma weitgehend minimiert. Als letzte Schicht wurde der Retractor-Muskel abpräpariert, unter dem eine dünne Faszien-schicht und der M. cutaneus maximus lag. Der Retractor-Muskel ließ sich ohne große Zugkräfte von den darunter liegenden Schichten abpräparieren. Dies war wichtig, denn welche drastischen Veränderungen bereits geringes Ziehen am Muskel bewirkt, zeigten LINDBOM et al. in der Tenuissimus-Muskelpräparation (Lindbom et al., 1982). Bei geringer Dehnung des Muskels kam es zu einem Anstieg der Gesamtdurchblutung um das 7-fache und der kapillären Blutzellgeschwindigkeit um 500 %. Dies wäre im übrigen auch eine Erklärung für die erhebliche Diskrepanz, die beim Vergleich des gesamten Organblutflusses und nach Extrapolation von direkten Messungen in der Mikrozirkulation bestehen (Intaglietta und Zweifach, 1974).

Es wurde deshalb in den vorliegenden experimentellen Untersuchungen den Tieren zunächst eine 48-stündige Erholungspause gewährt. Innerhalb dieses Zeitraumes konnte beobachtet werden, ob sich eine lokale Infektion oder eine nachfolgende Entzündung im Präparationsareal entwickelte und ob die Präparation den Kriterien einer intakten Mikrozirkulationspräparation genügte (siehe 5., Abschnitt Methodik).

Weiterhin sollte keine Neovaskularisation auftreten. Dies konnte wie in 2.3. der Methodik bereits dargelegt, durch Verwendung von Sichtfenstern aus Plexiglas erreicht werden (O'Donoghoe und Zarem, 1971; Eriksson und Zarem, 1977).

Damit entsprach die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Kammerpräparation all den von SEWELL genannten Kriterien.

Nur das Mikrozirkulationsmodell des Fledermausflügels erfüllt weitgehend diese Bedingungen (Wiedeman, 1957; Wiederhielm und Weston, 1973). Darüberhinaus muß an diesem Modell für die Beobachtung der Mikrozirkulation kein chirurgischer Eingriff durchgeführt werden. Das Areal, in dem der Muskel beobachtet werden kann, ist jedoch sehr klein, und die Tiere sind von zu geringer Körpergröße, um systemische Katheter für Druckmessungen plazieren zu können. Weiterhin lagen bisher keine Berichte über ein etabliertes Tumormodell in dieser Präparation vor. Damit war dieses Modell für die geplanten Untersuchungen der Tumormikrozirkulation ungeeignet.

Transparente Hautkammermodelle fanden bisher über mehr als fünf Jahrzehnte hinweg Anwendung, um auf mikroskopischer Ebene morphologische und hämodynamische Aspekte der Mikrogefäßsysteme zu beschreiben (Clark, 1935; Clark und Clark, 1939; Algire, 1943; Algire und Chalkley, 1945; Abell, 1946; Algire et al., 1947; Algire und Legallais 1947, 1949, 1951; Goodall et al., 1965; Bagge und Branemark, 1977; Nims und Irwin, 1973). U.a. konnten damit die Wachstumscharakteristika sich neu bildender Gefäße nach Transplantation von homologem und heterologem Gewebe erfaßt werden (Algire et al. 1947; Algire und Legallais, 1947, 1951; Goodall et al., 1965; Witte und Goldenberg, 1967). Zusätzlich war die Beobachtung und die Beschreibung der funktionellen Veränderungen einzelner Blutzellen während ihrer Passage durch Kapillaren möglich, sowie eine Analyse der Gefäßarchitektur (Bagge und Branemark, 1977) und die des Mikrogefäßnetzes (Goodall et al., 1965). In all den bisher dargestellten Modellen wurden jedoch nur sporadisch mikrozirkulatorische Parameter direkt gemessen. Da nur in wenigen Arbeiten eine gleichzeitige Quantifizierung von mikrohämodynamischen und makrohämodynamischen Meßgrößen durchgeführt wurde (Algire, 1954), besteht insbesondere in diesem

Bereich ein erheblicher Nachholbedarf (Chien und Lipowsky, 1982).

Es wurden deshalb den Syrischen Goldhamstern Dauerkatheter in die rechte V. jugularis und die rechte A. carotis communis implantiert. Damit war es an diesem Modell auch möglich, die makro- und mikrohämodynamischen Veränderung simultan zu erfassen. Erstmals wurde gezeigt, daß durch die Kombination von quantitativer Fluoreszenzvideomikroskopie, Fluoreszenzphotomakroskopie und Gewebeoberflächen- pO_2 -Messung eine umfassende Analyse einer Mikrozirkulationspräparation über einen Zeitraum von 12 Tagen durchgeführt werden kann.

Anhand dieser Messungen ergab sich zunächst folgendes Bild der Hautmuskelmikrozirkulation des Syrischen Goldhamsters.

Unmittelbar nach Kammerimplantation waren in dem Präparationsareal einige akute und vorübergehende Veränderungen zu beobachten (Endrich et al., 1980; Goetz et al., 1981). Die initiale Vasokonstriktion der Arteriolen war von einer arteriolären Vasodilatation mit erhöhtem Blutfluß in den Arteriolen und dem nachgeschalteten stromabwärts gelegenen Gefäßbett gefolgt. In einigen Präparationen zeigte sich auch ein vorübergehender Anstieg der Permeabilität für Makromoleküle nach Injektion von FITC-Dextran 150.000. Die erhöhte Permeabilität war meist im Bereich der Venolen und der Postkapillaren lokalisiert. Dies war häufig mit einem Anhaften von Leukozyten am Endothelwall dieser Gefäße verknüpft.

Waren derartige Phänomene am 2. Tag nach Implantation der Kammer noch immer zu beobachten, und genügten die Kammerpräparationen nicht den Auswahlkriterien einer intakten Mikrozirkulationspräparation, wurden sie vom weiteren Versuch ausgeschlossen (Abschnitt 5, Methodik). Weiteres Ausschlusskriterium war, wie bereits dargestellt, eine Entzündung oder Infektion im Implantationsbereich der Kammer oder im Katheterimplantationsbereich. Darüberhinaus mußte eine Funktionsfähigkeit der intravasal liegenden Dauerkatheter vorliegen.

Aufgrund dieser Ausschlusskriterien konnten nur etwa 70 % der Kammerpräparationen verwendet werden. Die Versuchstiere wurden auch dann nicht in den Versuch einbezogen, wenn sie sich im Laufe des Beobachtungszeitraumes von 12 Tagen entzündeten oder die Kriterien nicht mehr erfüllten. Einige Tiere,

die sich die intravasal liegenden Dauerkatheter herauszogen, verstarben im hypovolämen Schock. Schließlich waren nur etwa 50 % der Tiere in dieser Studie zu verwerten (n=63).

Bei den Tieren, die in dieses Versuchsprotokoll vollständig einbezogen werden konnten, ließ sich die Hautmuskelmikrozirkulation wie folgt charakterisieren. In den aufeinanderfolgenden Gefäßsegmenten, deren Klassifizierung an der von ZWEIFACH und ZWEIFACH und LIPOWSKY orientiert war (Zweifach, 1954, 1955, 1974, 1977; Zweifach und Lipowsky, 1977), konnten über den Beobachtungszeitraum keine signifikanten Veränderungen der Mikrohämodynamik gemessen werden. Dies galt für den Gefäßdurchmesser, die Blutzellgeschwindigkeit und den daraus berechneten Volumenfluß in den Transversalarteriolen, terminalen Arteriolen, Präkapillaren, Kapillaren, Postkapillaren, Venolen und Sammelvenolen.

Wenn sich bei einer dieser Messungen in den arteriolen Widerstandsgefäßen eine spontane Vasomotion zeigte, wurde der Mittelwert zwischen dem Maximal- und dem Minimalwert gebildet. Dies galt sowohl für die Fließgeschwindigkeit als auch für den Gefäßdurchmesser. Das Nichtvorhandensein einer spontanen arteriolen Vasomotion war im Gegensatz zu den Forderungen von INTAGLIETTA und MESSMER und MESSMER et al. kein Ausschlußkriterium für die Einbeziehung der Präparation in das Versuchsprotokoll (Intaglietta und Messmer, 1972; Messmer et al., 1984). Im Verlauf des Beobachtungszeitraumes war nachzuweisen, daß Präparationen, die möglicherweise am Tag 4 keine spontane arteriolen Vasomotion zeigten, dieses Phänomen durchaus am nächsten Beobachtungstag aufweisen konnten und möglicherweise am darauffolgenden Meßtag wiederum zu verlieren vermochten. Wäre dieses Phänomen als Ausschlußkriterium bewertet worden, hätten weitere 50 - 60 % der Tiere von den Untersuchungen ausgeschlossen werden müssen. Für die Einbeziehung der Tiere ohne Vasomotion in die Versuchsserie sprach außerdem, daß sie allen genannten Kriterien genügten, die unter 5. der Methodik beschrieben sind.

Wie die elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigten, lag in der vorliegenden Hautmuskelpreparation eine quergestreifte Muskulatur vor. Es war deshalb naheliegend, die erhaltenen Meßergebnisse mit den in der Literatur vorhandenen Daten über die Mikrozirkulation an anderen Muskelpreparationen zu vergleichen. Die Werte der kapillären Fließgeschwindigkeiten korrelierten mit den von LINDBOM et al. beschriebenen Werten für den Tenuissimus-Muskel des Kaninchens und der Katze, sowie mit den Fließgeschwindigkeitswerten im Cremaster-Muskel des Hamsters (Klitzman und Duling, 1979; Lindbom et al., 1980, 1982, 1984). In diesen Untersuchungen wurde jeweils der pO_2 im Superfusat variiert. Nimmt man den in dieser Arbeit gemessenen Mittelwert des Gewebeoberflächen- pO_2 von etwa 28 - 31 mmHg als den mittleren pO_2 -Wert im Superfusat an, so lagen die Kapillarfließgeschwindigkeitswerte sehr nahe bei den von LINDBOM et al. beschriebenen Werten, der bei einem pO_2 von 22 mmHg Werte zwischen 0,37 und 0,15 mm/sec angab und bei pO_2 -Werten von 35 mmHg Werte zwischen 0,13 und 0,34 mm/sec gemessen hatte. Darüberhinaus korrelierten die Meßwerte der Kapillardichte an erythrozyten-perfundierten Kapillaren mit denen des Tenuissimus-Muskels, die bei den eben beschriebenen pO_2 -Werten im Superfusat zwischen 138 und 254 mm/mm² lagen. Die in der vorliegenden Arbeit gemessenen Werte der Kapillardichte erythrozytenperfundierter Kapillaren reichten von 81 - 260 mm/mm² am Tag 0 und von 92 - 300 mm/mm² am Tag 12. Dieser Anstieg der Kapillardichte erythrozytenperfundierter Kapillaren über den Beobachtungszeitraum war statistisch nicht signifikant. Auch die Kapillardichte zeigte einen vergleichbaren Anstieg vom Tag 0 zum Tag 12. Die Tendenz zu einer höheren Kapillardichte erythrozytenperfundierter Kapillaren wird dahingehend interpretiert, daß im Verlauf des Beobachtungszeitraumes die Präparationsareale an Fettgewebe verloren hatten. Dies war auch aus der intravitalmikroskopisch gemessenen Verminderung der Größe der Fettgewebszellen zu entnehmen. Daraus resultierte eine Verminderung der mittleren Kapillarabstände und damit eine Erhöhung der Kapillardichte pro Gewebeeinheit.

Die Anzahl an nicht perfundierten Kapillaren lag durchschnittlich bei etwas mehr als 10 %. In der obengenannten Tenuissimus-Muskelpreparation lag diese bei etwa 60 % (Lindbom et al., 1982). Dies mag jedoch in der unterschiedlichen Funktion der beiden Muskel begründet sein. Über Vergleichsmessungen der Anzahl der nicht perfundierten Kapillaren in vivo an einem *M. cutaneus maximus* eines anderen Nagetieres lagen keine Berichte vor.

Da weder die Anzahl der nicht perfundierten Kapillaren noch die vice-versa Messung der funktionellen Kapillardichte, d.h. die Kapillardichte erythrozytenperfundierter Kapillaren, statistisch signifikant über den Meßzeitraum hinweg verändert waren, wurde dies erneut als Zeichen der Stabilität der verwendeten Präparation über den Beobachtungszeitraum von 12 Tagen gewertet. Dies zeigten auch die bereits erwähnten Messungen der Mikrohämodynamik. Trotz der Heterogenität der mikrohämodynamischen Meßwerte blieben der Median und die "Box", d.h. die zentralen 50 % der Meßwerte über die beobachteten 12 Tage hinweg konstant. Dies galt nicht nur für den kapillären Bereich, sondern auch für den jeweils vor- und nachgeschalteten Bereich des Mikrogefäßsystems.

Aufgrund der Mittelung der Blutzellgeschwindigkeit in den vorgeschalteten Arteriolen und wegen des Vorhandenseins spontaner arteriolärer Vasomotion in etwa 30 % der Präparationen ist erklärbar, daß die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Werte der präkapillären und arteriolären Blutzellgeschwindigkeiten unter den Werten lagen, die aus der Literatur bekannt waren (Gentry und Johnson, 1972; Zweifach, 1974; Fronek und Zweifach, 1977; Previtt und Johnson, 1976). Andererseits sprachen diese niedrigen Werte wiederum für die Qualität der Präparation. Denn wie bereits darauf hingewiesen lagen diese mikrozirkulatorischen Meßwerte der eben zitierten Arbeiten weit über den Meßergebnissen, die mit einer Durchblutungsmeßmethode für das Gesamtorgan erhoben wurden (Intaglietta und Zweifach, 1974).

Während dem Widerstandsgefäßsystem, d.h. der arteriolären Seite der Mikrozirkulation in hämodynamischer Hinsicht sehr viel Aufmerksamkeit entgegengebracht wurde, lagen nur wenige Meßwerte aus der venolären Seite des Mikrogefäßsystems dieser Muskelpreparationen vor. Es konnten deshalb lediglich Meßergebnisse aus anderen Gefäßpreparationen, wie dem Mesenterium, dem Omentum und dem Sukutangewebe der Ratten herangezogen werden. In diesen Preparationen wurden die Resultate allerdings ebenso wie die kapillären Blutzellgeschwindigkeiten unter Narkose erhoben. Darüberhinaus haben HAMMERSEN und HAMMERSEN dargestellt, "daß die gerade in der Mikrozirkulationsforschung häufig verwendeten, flächig ausgebreiteten Membransysteme, wie z.B. Mesenterium, Omentum und Hamsterbackentasche keinesfalls als repräsentativ für Musterbildung terminaler Strombahnen angesehen werden können" (Hammersen und Hammersen, 1986). Dennoch soll auf eine Übersicht über die entsprechenden Vergleichswerte venolärer Blutfließgeschwindigkeiten bei ENDRICH et al. hingewiesen werden (Endrich et al., 1981). Meßwerte aus dem Omentum und dem Mesenterium für postkapilläre und venoläre Geschwindigkeiten lagen bisweilen um mehr als 100 % höher als in der vorliegenden Preparation des subkutanen Hautmuskels (Schmid-Schoenbein und Zweifach, 1975; Zweifach und Lipowsky, 1977). Die am ehesten vergleichbare Fließgeschwindigkeit in den Venolen wurde im Subkutangewebe von Ratten erhoben. Sie lag mit einer Streuung von 0,19 bis 0,32 um etwa 20 - 30 % unter den Meßwerten in der vorliegenden Preparation.

Aus dieser Diskrepanz von Befunden der Mikrozirkulation verschiedener Gewebeareale eine pathologische Bedeutung für diese subkutane Muskelmikrozirkulation abzuleiten, ist nicht möglich. Denn im Vergleich zu allen anderen dargestellten Preparationen war die Hamsterhautkammer streng kontrolliert. Dies geht auch aus den einzelnen Kriterien, die hier angewendet wurden, hervor. Insbesondere war bei der Erhebung der Meßwerte im venolären und postkapillären Bereich festzustellen, daß in den Preparationen, die in die Darstellung der Meßwerte einbezogen wurden, kein Anhaften von Leukozyten am postkapillären Endothelwall und auch keine Permeabilitätssteigerung für Makromoleküle festzustellen waren.

Weiterhin soll auch an dieser Stelle nochmals ausdrücklich darauf hingewiesen werden, daß sowohl in den Untersuchungen, die den arteriolen Bereich, als auch in denen, die den kapillären und den venösen Bereich der Mikrozirkulation quantitativ erfaßt hatten, narkotisierte Tiere verwendet wurden. Wie bereits mehrfach erwähnt, resultieren daraus veränderte mikrohämodynamische Bedingungen (Longnecker und Harris, 1980 a, 1980b; Altura, 1980; Longnecker, 1982).

Die Reduktion des Mikrohämatokrits im Verhältnis zum systemischen Hämatokrit wurde erstmals von Fahraeus beschrieben (Fahraeus, 1928). In Studien, in denen der Volumenanteil der Erythrozyten am kapillären Volumen bestimmt wurde, schwankte der Mittelwert zwischen 20 und 48 % des Systemhämatokrites (Johnson, 1971; Johnson et al., 1973; Schmid-Schoenbein und Zweifach, 1975; Lipowsky et al., 1980; Kanzow, 1982). Dieses Phänomen läßt sich z.T. durch die besonderen Strömungs- und Hämatokritverhältnisse innerhalb der Mikrogefäße erklären. Da die Geschwindigkeitsprofile, wie auch die Hämatokritprofile einen Anstieg von der Gefäßwand zum Axialstrom hin zeigen, fließen die roten Blutkörperchen im Mittel schneller als das Blut. Daraus resultiert eine Verdünnung der roten Blutkörperchen, so daß der Mikrohämatokrit in einem solchen Gefäß niedriger ist, als der Anteil der Erythrozyten am Gesamtfluß durch das Gefäß. PRIES et al. konnten nachweisen, daß das Fahraeus-Prinzip aufgrund der Summation der Phasenseparationseffekte an aufeinanderfolgenden Gefäßaufzweigungen des Netzwerkes auch für das gesamte Gefäßnetzwerk Gültigkeit besitzt (Pries et al., 1985). Die in der vorliegenden Arbeit gefundenen Meßwerte, die mit Hilfe markierter Erythrozyten und einer neuen Methodik nach SARELIUS und DULING (Sarelius und Duling, 1982) bestimmt wurden, bestätigten die oben angegebenen Ergebnisse sowie die Gültigkeit des Fahraeus-Lindqvist-Effektes für die Hautmuskelgefäße der Hamsterrückenhautkammerpräparation. Diese Resultate sollten als Vergleich zu möglichen Veränderungen im Tumorgefäßsystem herangezogen werden.

Die bisher dargestellten Meßgrößen gehen als Determinanten der O_2 -Versorgung des Gewebes ein. Die vorliegenden Meßwerte zeigten homogen verteilte pO_2 -Summenhistogramme mit Mittelwerten zwischen 20 und 45 mmHg, wobei einzelne Mittelwerte über 40 mmHg lediglich am Tag 8 und 12 erhoben werden konnten. Die gemessenen Gewebeoberflächen- pO_2 -Werte lagen etwas höher als die bisher beschriebenen Mittelwerte anderer Muskelpräparationen (Whalen et al., 1974; Weiss et al., 1976; Klabunde und Johnson, 1977). Aufgrund der Verwendung von Stichelektroden in diesen Untersuchungen ist jedoch zu erwarten, daß dadurch möglicherweise falsch niedrige pO_2 -Werte gemessen wurden. Denn bei Verwendung von Nadelstichelektroden wird um die Elektroden ein hämorrhagischer Herd aufgebaut, der zu einer Verlängerung der Diffusionsstrecke führen kann. Hinzu kommt, daß durch die Kompression eine lokale Blutflußverminderung und damit eine Reduktion des Sauerstoffangebotes induziert wird. Darüberhinaus werden bei kontinuierlichem Verschieben der Stichelektroden mit Sicherheit auch intrazelluläre pO_2 -Werte erfaßt, die mit der hier verwendeten Meßmethodik nicht erfaßt werden konnten.

Spiegeln die gemessenen Gewebeoberflächen- pO_2 -Werte in der Tat den Gewebe- pO_2 , d.h. auch einen intrazellulären pO_2 wieder? Zur Beantwortung dieser Frage darf auf Meßergebnisse aus der eigenen Arbeitsgruppe, die in Zusammenarbeit mit Dr. P. Conzen und Dr. J. Hobbhahn am Institut für Chirurgische Forschung erhoben wurden, verwiesen werden. Während einer akuten Koronarstenose, die an der linken Koronararterie von Schweinen erzeugt wurde, konnten bei Absenkung des arteriellen Druckes durch Inhalationsanästhesie mit Isoflurane die lokale Freisetzung von Laktat aus dem poststenotischen Areal und simultan die Gewebeoberflächen- pO_2 -Werte in diesem Bereich gemessen werden. Es wurde eine enge Korrelation ($r = 0,84$) zwischen der Verminderung des pO_2 -Wertes und der Laktat-Freisetzung bei Isoflurane-induzierter Druckabsenkung gemessen. Das Laktat konnte hierbei über einen Katheter selektiv aus dem poststenotischen Areal abgenommen werden. Demgegenüber zeigten gemischtvenöse Werte aus dem Sinus coronarius z.T. noch keine Laktat-Umkehr und auch keinen erheblichen Abfall des gemischtvenösen pO_2 . Die enge Korrelation von Gewebeoberflächen- pO_2 und Laktatfreisetzung

ist ein eindeutiger und eindrucksvoller Beweis dafür, daß mit der pO_2 - Oberflächenelektrode frühzeitig hypoxische Areale erfaßt werden können und andererseits der gemischtvenöse pO_2 ein relativ später Indikator einer Gewebhypoxie ist. Dies bedeutet, daß der pO_2 des gemischtvenösen Blutes, wie bereits beschrieben, kein zuverlässiger Parameter für die Versorgungssituation des Gewebes sein kann (Lübbers, 1973; Kessler et al., 1976; Lübbers, 1977; Kessler et al., 1986).

Weitere stichhaltige Befunde, die die Intaktheit der entwickelten Präparation unterstrichen, lieferten die elektronenmikroskopischen Aufnahmen, anhand derer die strukturelle Integrität des Gefäßsystems, trotz des mikrochirurgischen Eingriffs nachgewiesen werden konnte. Die folgenden Darstellungen sollen als Vergleichsbasis für die im nachfolgenden Kapitel dargestellten Besonderheiten der Ultrastruktur der Tumorgefäße dienen.

Eine morphologische Charakterisierung der Gefäßsegmente in der Mikrozirkulation kann nach der Klassifizierung, wie sie von RHODIN beschrieben wurde durchgeführt werden (Rhodin, 1968). Danach werden die einzelnen Gefäßtypen anhand der luminalen Gefäßdurchmesser, des Endothels, des Vorhandenseins einer subendothelialen Basalmembran und der Verteilung der glatten Muskelzellen charakterisiert. Kleinere Arteriolen bis zu 100 μm zeigen ein kontinuierlich hohes Endothel mit mehrschichtig darüberliegenden glatten Muskelzellen. In den darauffolgenden Gefäßsegmenten wird die Schicht der glatten Muskelzellen einschichtig und geht in den präkapillaren Arealen zu einer lückenhaften, häufig zirkulär angeordneten glatten Muskelzellenanordnung über. Eine subendotheliale Basalmembran ist in diesen Arealen immer vorhanden. Das Endothel ist vom kontinuierlichen Typ und hochgebaut. Die von RHODIN klassifizierten Arteriolen entsprechen den Transverasarteriolen in dieser Hautkammerpräparation und z.T. auch den terminalen Arteriolen, während die Präkapillaren bei RHODIN den terminalen Arteriolen und den Präkapillaren in der vorliegenden Präparation entsprechen. Die verwendete Nomenklatur wurde anhand der Funktion der einzelnen arteriolen und venolären Segmente vorgenommen (Zweifach, 1974).

Da von allgemeinem physiologischen Interesse soll an dieser Stelle kurz auf die 'präkapillären Sphinkteren' eingegangen werden. Nach HAMMERSEN handelt es sich hierbei um sog. End- oder Metarteriolen, die kleine Gefäße abgeben, und an deren Gefäßende sich beim Frosch 2 oder 3 glatte Muskelzellen nachweisen lassen, die zirkulär um das Gefäß gewickelt sind. Dies führte auch zu der Bezeichnung des "präkapillären Sphinkters" (Hammersen, 1982). Das entsprechende Korrelat dieser Struktur konnte beim Warmblütler nicht nachgewiesen werden. Wie in unseren Präparationen zu beobachten war, erfüllten diese Funktion die gesamten arteriolen Abschnitte, insbesondere die terminalen Arteriolen und die präkapillären Gefäße. Dies konnte bei Vorhandensein von spontaner arteriöler Vasomotion vitalmikroskopisch beobachtet werden. Entsprechend schlugen RHODIN und HAMMERSEN aufgrund dieser morphologischen Befunde an Warmblütlern und aufgrund der vitalmikroskopischen Untersuchungen vor, für den Begriff des "präkapillären Sphinkters" das Öffnen und Schließen des gesamten Einstromabschnittes in einem terminalen Gefäßbett zu verwenden.

Neben diesem arteriölen Gefäßabschnitt wurde dem Endothel und der Kapillarwand besondere Aufmerksamkeit entgegengebracht. In Anlehnung an ALTSCHEL lässt sich die Kapillarwand durch das Endothel, die Basalmembran und die Adventitia, d.h. die Perizyten differenzieren (Altschul, 1954). In Anlehnung an die Klassifizierung von MAJNO lassen sich zusätzlich verschiedene Endotheltypen unterscheiden (Majno, 1965). Es werden Endothelien vom kontinuierlichen, fenestrierten und diskontinuierlichen Typ beschrieben. Dies entspricht Kapillaren mit einem geschlossenen, porenhaltigen oder lückenhaften Endothel. In der vorliegenden Präparation der Rückenhautkammer wurden Endothelzellen vom geschlossenen Typ gefunden, deren Höhe zwischen 0,05 und 1 μ m variierte. Im Zytoplasma waren Mitochondrien, das endoplasmatische Retikulum und Ribosomen, sowie weitere Zellorganellen nachzuweisen. Zusammen mit der Intaktheit der Mastzellen waren diese Befunde Ausdruck der Unversehrtheit und der Integrität dieser chronischen Mikrozirkulationspräparation. Auf eine weitere Differenzierung des Endothels soll hier im folgenden nun nicht mehr eingegangen werden. Es darf hierzu auf die Ar-

beiten von HAMMERSEN verwiesen werden (Hammersen, 1977, 1981; Hammersen et al., 1982, 1983)

Zusammenfassend läßt sich das im Rahmen dieser Arbeit entwickelte chronische Mikrozirkulationsmodell damit wie folgt charakterisieren:

In Präparationen, die die Kriterien einer intakten Mikrozirkulation zeigten, konnten quantitative Untersuchungen der Mikrozirkulation über einen Zeitraum von mehr als 2 Wochen durchgeführt werden. Die einzelnen erhobenen Parameter der Mikrohämodynamik, d.h. Gefäßdurchmesser, Blutzellgeschwindigkeit, Mikrohämatokrit, Erythrozytenfluß und Erythrozytenfließgeschwindigkeit konnten hierbei quantitativ erfaßt und exakt den einzelnen aufeinanderfolgenden Gefäßsegmenten dieses Mikrogefäßnetzwerkes zugeordnet werden. Das Modell, das im wesentlichen als Muskelpräparation charakterisiert werden kann, erlaubte darüberhinaus die Erfassung der Kapillardichte, der Dichte erythrozytenperfundierter Kapillaren (funktionelle Kapillardichte), sowie der Anzahl, der nicht an der Perfusion beteiligten Gefäßsegmente, und der Kapillarlängen.

Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen zeigten, daß Kapillaren vom kontinuierlichen Typ vorlagen. Dies ist typisch für die Skelettmuskulatur. Die Intaktheit und Integrität des Gefäßendothels und das Vorhandensein von Mastzellen sprachen neben den mikrozirkulatorischen Befunden für die Qualität dieses Mikrozirkulationsmodells. Es war weiterhin möglich, Messungen des Gewebeerflächen- pO_2 , sowie eine Quantifizierung der Permeabilitätsänderungen durchzuführen. Erste Ansätze hierzu wurden mit einem Bildsubtraktionssystem geliefert (siehe 5. Diskussion).

Die im einzelnen erhobenen Meßwerte stimmten, was die Muskelpräparation anbelangte, weitgehend mit den in der Literatur angegebenen Werten überein. Die wesentlichen Vorteile dieses Modells gegenüber anderen Mikrozirkulationspräparationen und gegenüber anderen Kammerpräparationen lagen darin, daß eine hohe Transparenz der Präparation gewährleistet war und damit eine sehr hohe mikroskopische Auflösung. Das Gewebe mußte nicht befeuchtet werden und das Trauma während der Präparation konnte so gering gehalten werden, daß keine Neovaskularisation nachzuweisen war. Wesentlichster Vorteil

dieses Modells war, daß für die einzelnen Untersuchungen keine Narkose durchgeführt werden mußte.

All diese Vorzüge haben letztendlich zum Erfolg dieses Modells geführt und zur Anwendung der Präparation in drei verschiedenen Mikrozirkulationslabors. Aufgrund der beschriebenen Vorteile wurden an dem Modell Untersuchungen über vasoaktive Substanzen (Jensen et al., 1983; Goetz et al., 1987a, 1987b), Anästhetika (Franke et al., 1982a, 1982b; Goetz et al., 1986a, 1986b), Hämodilution (Baldinger et al., 1984), Hypothermie (Endrich et al., 1982c), die spontane arterioläre Vasomotion (Colantuoni et al., 1982; Funk et al., 1983a, 1983b; Intaglietta und Messmer, 1983; Colantuoni et al., 1984a, 1984b) und über den Einfluß von Schockwellen auf die Mikrozirkulation (Brendel et al., 1987) durchgeführt. In Kombination mit dem amelanotischen Hamstermelanom A-Mel-3 wurden tumorspezifische Fragestellungen bearbeitet (Asaishi et al., 1981; Endrich und Meßmer, 1981; Endrich et al., 1982a, 1982b; Oda et al., 1982; Endrich, 1984; Goetz et al., 1985, 1986c, 1987c). Auf die Besonderheiten der Tumormikrozirkulation wird im folgenden Abschnitt noch näher eingegangen.

3. Tumormikrozirkulation

Die Mehrzahl der Untersuchungen zur Tumormikrozirkulation befaßten sich in erster Linie mit der tumortypischen Angioarchitektur und mit der Gefäßmusterbildung im Frühstadium des Wachstums, d.h. mit der Tumorneoangiogenese. Studien über die tumortypische Gefäßanordnung gehen zurück auf Untersuchungen von VIRCHOW (Virchow, 1863) und THIERSCH (Thiersch, 1865), die beide beschrieben, daß das Tumorgefäßsystem sich durch Besonderheiten in der Morphologie der Gefäßwände und der Angioarchitektur auszeichnet. Die nachfolgenden Berichte bis gegen Ende der sechziger Jahre dieses Jahrhunderts beschäftigten sich im wesentlichen mit dem Einsatz des Tumorgefäßmusters als diagnostisches Hilfsmittel, und mit der Wertigkeit des Wissens über die Gefäßanordnung in spezifischen Tumoren unter Berücksichtigung pharmakologischer und radiotherapeutischer Gesichtspunkte. Darüberhinaus waren die Untersucher interessiert an der Bedeutung des Gefäßsystems in der Biologie des Tumors, d.h. während der Entstehung des Tumors und während des Tumorwachstums als Faktor, der die Verteilung lebender, sterbender und bereits abgestorbener Tumorzellen diktiert. Das Interesse galt auch der Rolle des Gefäßsystems bei der Entwicklung von Metastasen, d.h. unter anderem der Freisetzung von Tumorzellen aus dem Tumor in das Gefäßsystem. Eine hervorragende Übersicht zu diesen Fragen bieten die Arbeiten von WARREN (Warren, 1979a,b). In beiden Arbeiten wurden auch all die Probleme, die sich mit der Gefäßmorphologie i.S. der architektonischen Anordnung der Gefäße beschäftigten, sowohl für experimentelle als auch für menschliche Tumoren dargestellt.

Nachteil der früher verwendeten Modelle war, daß meist verschiedene Tumorstadiumsstadien miteinander verglichen werden mußten, daß meist Tumorgewebestückchen zur Tumorinduktion an Stelle von Tumorzellen implantiert wurden und, daß dynamische Aspekte an einem Tumor nicht über einen längeren Zeitraum verfolgt werden konnten. Dennoch waren die Untersucher in der Lage differenzierte Aussagen über die Veränderungen der Tumorgefäßmorphologie und der Tumorgefäßarchitektur in diesen Experimentaltumoren zu machen

(Goldman, 1907; Lewis, 1927; Ide et al., 1939; Algire et al., 1943, 1945, 1947a, 1947b; Lutz et al., 1950; Waters und Green, 1959; Pligermann und Hanel, 1961; Gullino et al., 1962; Gullino und Grantham, 1962; Cataland, 1962; Goldacer und Sylven, 1962; Delarue et al., 1963; Day, 1964; Witte und Goldenberg, 1965; Goodall et al., 1965). In all diesen Arbeiten wurden einige Gemeinsamkeiten immer wieder hervorgehoben. Zunächst wurden die Tumore durch eine chaotische Anordnung der Gefäße charakterisiert. Stellvertretend für alle weiteren Kennzeichen kann die Arbeit von DELARUE et al. herangezogen werden (Delarue, 1963). Die Publikation verdient auch deshalb Aufmerksamkeit, da ebenso wie in der vorliegenden Studie ein Hamster-Melanom als Tiermodell Verwendung fand.

Diese Arbeitsgruppe war darüberhinaus eine der wenigen, die die Veränderungen der Gefäßstrukturen im Verlauf des Tumorwachstums beschrieben. Quantitative Messungen wurden jedoch nicht durchgeführt. Es wurden ein bis zwei ³ mm große Gewebsstücke eines Melanoms in die Hamsterbackentasche implantiert und das Tumorwachstum über mehr als 30 Tage hinweg beobachtet. Ebenso wie in den von uns durchgeführten Untersuchungen wurde beobachtet, daß es zunächst zu einer Erweiterung von Kapillaren und venolären Gefäßsegmenten an den ersten beiden Tagen kommt. Zwischen Tag 4 und 6 erschien der Tumor vaskularisiert und an den folgenden Tagen wuchs dieser sphärisch weiter. Innerhalb von 30 Tagen hatte der Tumor die Größe einer Haselnuß erreicht. Die Morphologie der Gefäße unterschiedlicher Tumore wurde nach Injektion von "india-ink" untersucht. Im Zentrum wurde im fortgeschrittenen Tumorstadium eine avaskuläre Nekrose beobachtet. Um den Nekroseherd waren vitale Tumorzellen und ein Gefäßnetz angesiedelt, das dem von Kapillaren entsprach und reich anastomosierte. Die Gefäße waren gewunden, unregelmäßig aufgezwiegt und wiesen Aussackungen am Gefäßwall auf. In der peripheren Zone des Tumors zeigten die Gefäße größere Gefäßdurchmesser. Über der Konvexität der Tumoroberfläche wurden mehrere aufgeweitete venöse Kanäle mit paralleler Anordnung vorgefunden. Zahlreiche Äste aus dem Tumor mündeten in diese Gefäße. Über ähnliche Beobachtungen berichtete auch ALGIRE in einem Maus-Melanom (Algire, 1943) und WARREN in zwei amelanotischen Melanomen, die in die Hamsterbackentasche implantiert worden waren (Warren

et al., 1978a, 1978b). In der letztgenannten Arbeit wurde darauf hingewiesen, daß sich die Tumore wohl in ihrer Wachstumsgeschwindigkeit, jedoch nicht in ihrer tumortypischen Angioarchitektur unterscheiden.

Aus all diesen Untersuchungen wurde gefolgert, daß im Zentrum des Tumors eine Nekrose mit Gewebehypoxie, -anoxie und Gewebsazidose vorliegt. Demgegenüber fand nach Meinung dieser Autoren am Tumorrandbereich eine Gefäßproliferation und Tumorphiliferation statt, wobei die Neovaskularisation an das Wirtsgewebe anschließe, bzw. vom Wirtsgewebe ausginge.

Nach gegenwärtiger Meinung ist die primäre Tumorangiogenese die Bildung von Kapillarsprossen, die von Tumorzellen durch Bildung und Freisetzung eines Neoangiogenesefaktors induziert wird (Folkman et al., 1971; Cavallo et al., 1973; Folkman, 1975; Folkman und Cotran, 1976; Ausprunk und Folkman, 1977; Folkman, 1982). Möglicherweise kann sich aus den Sproßbildungen ein neues Mikrogefäßnetz einer proliferierenden Tumormasse entwickeln. Die Neovaskularisation ist zunächst nicht tumortypisch, sondern kann mit der Bildung von Kapillarsprossen im Granulationsgewebe einer Wunde verglichen werden (Clark und Clark, 1939; Algire, 1945; Cliff, 1963; Schoefl, 1963; Engerman et al., 1967; Spaet und Lejnieks, 1967). Möglicherweise sind im Unterschied dazu an der Angiogenese jedoch Tumorzellen selbst beteiligt (Goodall et al., 1965; Tannock et al., 1968, 1970; Warren et al., 1978a, 1978b; Hirst et al., 1982; Hammersen et al., 1983, 1985). Nach Bildung eines Tumorgefäßnetzes kann eine sekundäre Angiogenese hinzukommen, die von den Tumorgefäßen ausgehen kann (Warren 1978a, 1978b; Hammersen et al., 1983).

Über das Schicksal der vom Tumorgewebe inkorporierten präexistierenden Gefäße liegen ebenfalls Befunde vor. LINDGREN berichtete, daß die vorhandenen Gefäße des Normalgewebes bei einer Tumordinvasion zerstört, und erhaltene Gefäße praktisch nur noch in der Peripherie maligner Tumoren aufzufinden sind (Lindgren, 1945). Mit diesen Berichten korrelieren die Befunde, die in Adenokarzinomen der menschlichen Niere erhoben wurden. Dort konnte ein Fehlen adrenerger Einflüsse gezeigt werden. Nur an den in das Tumorgewebe inkorporierten Arterien konnte eine geringe adrenerge Innervation nachgewie-

sen werden (Mattsson et al., 1979). Mit diesen Befunden gehen die Berichte von WILLIS und Mitarbeitern einher, daß die Arterien häufig von einer Tumorzellinvasion verschont blieben (Willis, 1978). Dies wird auch gestützt von den Untersuchungen von INTAGLIETTA et al., der von in die Tumormasse inkorporierten Arteriolen berichtete, und daran keine sichtbaren strukturellen Veränderungen nachweisen konnte (Intaglietta et al., 1977).

Trotz dieser gut untersuchten morphologischen Anordnung und Besonderheiten der Gefäße im Tumor lagen nur wenige detaillierte Berichte über die mikrohämodynamischen Veränderungen im Tumorgefäßsystem vor. Nahezu alle Untersuchungen, die sich mit der Tumordurchblutung auseinandersetzten, wurden mit Methoden durchgeführt, die keine differenzierten Aussagen über Veränderungen an einzelnen Gefäßsegmenten zuließen. Es erfolgte meist nur eine Mittelung von Werten über das gesamte Tumorgefäßnetzwerk und über die gesamte Tumordurchblutung. Noch 1961 schrieben GULLINO und GRANTHAM "unseres Wissens ist die Bestimmung der Blutversorgung von Tumoren ein ungelöstes Problem" (Gullino und Grantham, 1961). Die Hauptursache für dieses Problem lag in den methodischen Schwierigkeiten bei der Bestimmung der Tumordurchblutung. Diesbezüglich darf auf den methodischen Teil der Diskussion hingewiesen werden.

Mit der Einführung neuer Methoden konnten einige charakteristische Eigenschaften der Tumordurchblutung immer wieder nachgewiesen werden. So wurde in vielen Studien eine Abnahme der Tumordurchblutung während des Tumorstadiums beschrieben (Gullino und Grantham, 1961; Vaupel, 1974, 1982; Kjartansson et al., 1973; Kjartansson, 1976; Endrich et al., 1979b). In den Experimentaltumoren wurden häufig zentrale Nekrosen beobachtet, die während des Wachstums an Ausdehnung zunahmen.

In Untersuchungen zur Morphologie und zur Verteilung des Intra- und Extravasalraumes, die mittels einer Isotopentechnik an transplantablen Ratten-sarkomen und im Rattenmuskel durchgeführt wurden, konnte nicht nur eine heterogene Verteilung der einzelnen Kompartimente, sondern auch der vitalen und nekrotischen Gewebeareale nachgewiesen werden (Karlsson et al., 1980).

Weitere Untersuchungen, die mit ^{86}Rb -Rubidium (Cataland et al., 1962), mit ^{131}I -Jod-Antipyrin (Edlich et al., 1966; Song et al., 1972), ^{131}Xe -Xenon-Clearance (Peterson, 1979; Mattsson, 1980, 1982; Mäntylä, 1982) durchgeführt worden waren, zeigten mitunter erhebliche Variationen der Tumordurchblutung. Dies ist auf dem Boden der genannten Untersuchung von KARLSSON nicht überraschend.

Nach der Hypothese von TANNOCK (Tannock, 1970) beruht die Durchblutungsabnahme während des Tumorwachstums wahrscheinlich einerseits auf den sehr unterschiedlichen Wachstumsraten von Endothelzellen, die 50 - 60 Stunden betragen und von Tumorzellen, die nur 22 Stunden betragen. Diese Befunde erfuhren durch unlängst publizierte Arbeiten von GABBERT und WAGNER ihre Bestätigung, die zeigen konnten, daß dies sowohl für differenzierte als auch für undifferenzierte Tumore gilt (Gabbert und Wagner, 1983). Andererseits wurde auch vermutet, daß die Durchblutungsabnahme aufgrund einer stetigen Zunahme des interstitiellen Gewebedruckes und damit aufgrund einer fortschreitenden Nekrose zentraler Tumorgefäße zustande kommt (Wiig et al., 1981, 1982).

Demgegenüber konnten bereits im Jahre 1952 BIERMAN et al. zeigen, daß im gemischtvenösen Blut verschiedener maligner Tumore ein erhöhter Sauerstoffgehalt vorliegt (Biermann et al., 1952). Daraus wurde auf das Vorhandensein von arterio-venösen Shunts rückgeschlossen. Diese Shunt-Durchblutung bei gleichzeitig verminderter nutritiver Durchblutung galt nach Meinung einiger Autoren als eine der wesentlichen Ursachen für die Gewebehypoxie in Tumoren (Vaupel, 1977; Endrich et al., 1982). All diese Ergebnisse und Schlußfolgerungen beruhten meist auf indirekten oder globalen Meßmethoden, ohne Aussagen über die Perfusion einzelner Gefäße machen zu können. Erste Beschreibungen der Perfusion von Tumorkapillaren liegen bereits mehr als 2 Jahrzehnte zurück (Scheid, 1961). Nahezu 20 Jahre später wurden dann erste quantitative Messungen im Tumorgefäßsystem von ENDRICH et al. durchgeführt (Endrich et al., 1979a, 1979b, 1979c). Nach eigenen Angaben dieses Autors sind diese Ergebnisse jedoch vorsichtig zu bewerten, da diese Tumorpräparationen in den Ratten kontinuierlich von einer Entzündungsreaktion begleitet waren. Damit konnten hämodynamische Nebenwirkungen von der Mikrozirkulation

der entzündeten Gewebe auf die Mikrozirkulation der wachsenden Tumore nicht ausgeschlossen werden.

Bei Wertung der vorliegenden Meßergebnisse stellte sich die dynamische Entwicklung der Tumorperfusion wie folgt dar:

Das Tumorgefäßsystem wurde durch eine auf den Kapillaren und den Postkapillaren des Wirtsgewebes aufbauende Neoangiogenese gebildet. Bereits am Tag 4 lag ein neu gebildetes Tumorgefäßnetz vor. Dieses Gefäßnetz anastomosierte reich und zeigte z.T. bereits Aussackungen und erhebliche Durchmessersprünge auf einer Gefäßstrecke von wenigen μm . Die funktionelle Kapillardichte war im Vergleich zum Wirtsgewebe signifikant erhöht und es lagen nur wenige Kapillaren vor, die nicht von Erythrozyten perfundiert waren. Bereits zu diesem Zeitpunkt war der Mikrohämatokrit im Tumor gegenüber dem Mikrohämatokrit im Wirtsgewebe signifikant erhöht. Eine derartige Steigerung des Mikrohämatokrites um 70 % bedeutet nach in-vitro Meßergebnissen eine erhebliche Zunahme des Gefäßwiderstandes (Schmid-Schoenbein, 1979). Zusätzlich wurde der Gefäßwiderstand durch das Vorhandensein von sog. weißen amorphen Konglomeraten im Intravasalraum erhöht. Die amorphen Konglomerate konnten nach der Methode von TANGELDER et al. durch Markierung mit Acridine-Orange als Thrombozytenaggregate identifiziert werden (Tangelder et al., 1982). Diese Thrombozytenaggregationen bildeten sich am Gefäßwall und wurden dann durch den Blutstrom abtransportiert. Sie trugen damit nicht nur zur Erhöhung der korpuskulären Anteile im Blutstrom bei, sondern dadurch auch zu einer erhöhten Viskosität. Mit der hier durchgeführten Messung des Mikrohämatokrites konnte dies nicht erfaßt werden. Der segmentale Mikrohämatokrit in den Tumorgefäßen lag damit noch höher als hier berechnet wurde.

Darüberhinaus wurde der Fließwiderstand sicherlich auch durch die Adhärenz der Thrombozyten am Gefäßwall erhöht.

Der Effekt der Hämokonzentration, abgeleitet aus der Erhöhung des Mikrohämatokrites konnte erstmals direkt in den einzelnen Gefäßsegmenten im Tumor nachgewiesen werden. Dieser Befund steht im übrigen im Einklang mit dem indirekten Rückschluß auf eine Hämokonzentration im Tumor durch VAUPEL und KALLINOWSKI (Vaupel und Kallinowski, 1986). Ihr Vergleich der Hämoglobinkonzentration und der Hämatokritwerte im arteriellen und tumor-venösen Blut zeigte in einer Kontrollgruppe keine signifikanten Unterschiede, jedoch in der Gruppe der tumortragenden Tiere einen hochsignifikanten Anstieg im tumor-venösen Blut. Daraus wurde auf eine gesteigerte transkapilläre Nettofiltration geschlossen und somit auf einen erhöhten Flüssigkeitstransport im Interstitium der Tumore, da bekannterweise eine effiziente Lymphdrainage im Tumor auszuschließen ist (Gullino, 1975; Peters et al., 1980).

Dieser indirekte Rückschluß konnte in der vorliegenden Untersuchung direkt gemessen werden, indem gezeigt wurde, daß bereits am Tag 4 ein erhöhter Mikrohämatokrit und eine erhöhte Permeabilität für Makromoleküle im Tumor im Vergleich zum tumorumliegenden Gewebe bzw. zum Wirtsgewebe nachzuweisen war.

Es waren relativ frühzeitig sog. fokale Austritte des FITC-Dextrans sichtbar. Dies war von einer Permeabilitätserhöhung im gesamten Tumor begleitet, d.h. es kam zu einem Austritt von Proteinen in das Interstitium. Diese relativ hohen Proteinkonzentration in der interstitiellen Flüssigkeit trugen zur Steigerung des hydrostatischen Druckes in diesem Kompartiment bei, da die Erhöhung des kolloidosmotischen Druckes in diesem Flüssigkeitsraum die Reabsorption von Flüssigkeit in die Gefäßlumina verhinderte. Bisher konnten in der interstitiellen Flüssigkeit von Tumoren Proteinkonzentrationen von 67 - 97 % der entsprechenden Plasmakonzentration nachgewiesen werden (Burgess und Sylven, 1962; Gullino 1975). Der Normwert liegt bei 30 - 50 % der Plasmakonzentration.

Zusammengefaßt tragen all diese Effekte zu einer Erhöhung des Perfusionswiderstandes im Tumor bei.

Als weiterer Faktor zur Erhöhung des Gesamtgefäßwiderstandes im Tumor muß die Längenzunahme der Gesamtgefäßstrecke im Tumor durch die kontinuierliche Neovaskularisation des Tumorgefäßsystems miteinbezogen werden. Das Tumorgefäßsystem erweiterte sich quasi im Nebenschluß. Damit wurde fortlaufend eine weitere Widerstandsstrecke für das Gefäßsystem eröffnet. Dies konnte jedoch zu diesem frühen Zeitpunkt des Tumorwachstums durch eine Weitstellung arteriöler Gefäße und damit durch eine erhöhte Durchblutung kompensiert werden. Über den herrschenden Perfusionsdruck, bzw. den interstitiellen Druck können aus den vorliegenden Untersuchungen keine Aussagen gemacht werden, da bei derartigen Messungen die Präparationen sofort hätten verworfen werden müssen. Eine Erhöhung des Perfusionswiderstandes kann jedoch aus den oben genannten Darstellungen mit Sicherheit abgeleitet werden. Die bisher von anderen Autoren durchgeführten Messungen, die einen erhöhten interstitiellen und einen erniedrigten intravasalen Druck im Tumor ergeben hatten, untermauern diese indirekte Schlußfolgerung (Peters et al., 1980; Wiig et al., 1981, 1982).

Bereits 4 Tage später stellte sich ein völlig verändertes Tumorsystem dar. Es zeigten sich erhebliche Unterschiede zwischen Tumorrand und Tumorzentrum. Im Tumorzentrum waren Gefäßdurchmesser und Volumenfluß signifikant vermindert. Auch die Blutzellgeschwindigkeit war reduziert, jedoch war dieser Unterschied nicht signifikant. Es zeigte sich nach wie vor eine starke Heterogenität der gemessenen Werte. Mit diesen Befunden einher ging eine hochsignifikante Reduktion der Kapillardichte und der Anzahl an nicht perfundierten Kapillaren. Darüberhinaus zeigte sich eine Intensivierung der Hämokonzentration, wie aus einer weiteren Steigerung des Mikrohämatokrites abgeleitet werden konnte. Der Median der Mikrohämatokrite lag nun um mehr als 100 % über dem des Mikrohämatokrites im Normalgewebe. Dies war von einer verstärkten Permeabilität für Makromoleküle begleitet. Dieser makromolekulare Permeabilitätsanstieg war aufgrund der elektronenoptischen Befunde nicht überraschend. Ultrastrukturelles Korrelat dieses Befundes waren Endothelrisse im Gefäßwall der Tumorgefäße. Manchmal konnten Erythrozyten durch diese Endothellücken aus dem Gefäßlumen in das Interstitium eindrin-

gen. Am Bau der Gefäßwände schienen Tumorzellen direkt beteiligt. Als Ursache dieser rudimentären Gefäße mit unzureichender Gefäßwandbildung wurde eine ineffiziente sekundäre Neoangiogenese angesehen (Warren, 1978a, 1978b; Hammersen et al., 1983, 1985). Die signifikant verminderte Kapillardicht im Tumorzentrum war Spiegelbild dieser rudimentären Gefäßneubildung.

Die ortsständigen terminalen Arteriolen und transversalen Arteriolen zeigten eine hochsignifikante Vasodilatation im Vergleich zum Ausgangswert vor Tumorzellimplantation. Bereits zu diesem Zeitpunkt waren diese arteriolen Gefäße maximal dilatiert und eine verbesserte Versorgung des Tumors konnte nur noch über eine Erhöhung des Perfusionsdruckes erzielt werden. In keinem Fall wurde zu diesem Zeitpunkt des Tumorzustandes eine spontane arteriolen Vasomotion eines tumorversorgenden Gefäßes bis zu einer Okklusion hin beobachtet. In Normalgewebspräparationen war dies in etwa 30 - 40 % der Präparationen zu beobachten. Nach FUNK et al. bewirkt dieser Ausfall der spontanen arteriolen Vasomotion eine Erhöhung des Gefäßwiderstandes (Funk et al., 1983a, 1983b). Als Ausdruck der ineffizienten Gefäßwand wurden vermehrt Thrombozytenaggregationen in den Tumorgefäßen beobachtet. Offensichtlich verursachten diese Endothellücken eine Gerinnungsaktivierung i.S. eines Reparationsmechanismus.

Diese Effekte trugen gemeinsam zu einer weiteren Erhöhung des Perfusionswiderstandes im Tumorzentrum bei. Hinzu kam, daß sich bei gleichbleibender Versorgung erneut im Nebenschluß neue Tumorgefäße gebildet hatten. Da die arteriolen Gefäße bereits völlig weitgestellt waren, konnte der erhöhte Gefäßwiderstand nur durch eine Erhöhung des Perfusionsdruckes oder eine Verbesserung der rheologischen Eigenschaften des Blutes überwunden werden. In der Tat konnte ENDRICH zeigen, daß es unter isovolämischer Hämodilution (Messmer, 1975), d.h. bei Absenkung des Hämatokrites und Verminderung der Viskosität zu einer Verbesserung der kapillären Durchblutung und des Gewebeerflächen- pO_2 kommt (Endrich, 1984). Eine Verbesserung der rheologischen Eigenschaften des Blutes hat demnach eine verbesserte Versorgung im Tumorzentrum zur Folge.

Als Ausdruck der morphologischen und hämodynamischen Befunde konnten wir im Zentrum des Tumoreals eine bisweilen bereits massive Gewebhypoxie mit mehr als 25 % der Gewebeerflächen- pO_2 -werte im potentiell hypoxischen und anoxischen Bereich messen. Diese Befunde deckten sich mit den bekannten Angaben aus der Literatur. Daraus darf gefolgert werden, daß in diesen Bezirken des Tumors bereits eine Gewebeazidose vorlag. Diese Gewebeazidose, die im übrigen auch von VAUPEL et al. nachgewiesen werden konnte (Vaupel et al., 1981; Vaupel, 1983), trug erneut über eine Erhöhung der Rigidität der Erythrozyten, zur Erhöhung der Viskosität und damit zur Erhöhung des Gefäßwiderstandes bei (Schmid-Schoenbein, 1979). Eine Erhöhung der Viskosität bewirkte weiterhin eine Verminderung der Blutzellgeschwindigkeit und damit eine Erhöhung des Mikrohämatokrites, d.h. eine Verstärkung der Hämokonzentration im Tumorzentrum.

Demgegenüber wurde in Relation dazu im Tumorrandgebiet eine signifikant erhöhte Kapillardichte, ein signifikant verminderter Anteil an nicht perfundierten Kapillaren und ein signifikant erhöhter Gewebeerflächen- pO_2 gemessen. Der Gewebeerflächen- pO_2 im Tumorrandareal lag um 400 % über dem des Tumorzentrums. Diese Diskrepanz zwischen pO_2 im Tumorzentrum und Tumorrand wurde weiter verstärkt am Tag 12 mit einem Verhältnis der mittleren pO_2 -Werte von 2 mmHg zu 19,6 mmHg. Als Ursache für diese weitere Intensivierung der Gewebhypoxie waren dieselben Mechanismen wie am Tag 8 verantwortlich zu machen. Die Signifikanzniveaus lagen im Zwischengruppenvergleich höher als am Tag 8 und es waren auch signifikante Veränderungen im Vergleich zum Tag 8 nachzuweisen.

Bei bereits signifikant verminderter Kapillardichte waren mehr als 30 % der Kapillaren nicht mehr perfundiert. Die Fließgeschwindigkeit war inzwischen signifikant gegenüber dem Tumorrandareal vermindert und der Volumenfluß hochsignifikant gegenüber dem Tumorrand reduziert. Alle bereits soeben beschriebenen Effekte waren deutlicher ausgeprägt als am Tag 8. Dies läßt vermuten, daß eine weitere Erhöhung des Perfusionswiderstandes im Tumorzentrum vorlag. Am Tag 12 zeigte sich neben diesen Befunden eine drastisch erhöhte Permeabilitätssteigerung im Tumorzentrum. Bisweilen waren

sogar Durchtritte von Erythrozyten durch die Gefäßwände, d.h. Mikrohämorrhagien in zentralen Bereichen des Tumors zu beobachten, sowie auch kleinere avaskuläre Bezirke mit Durchmessern von mehr als 200 μm . Aus diesen Befunden und der deutlichen Permeabilitätssteigerung für FITC-Dextran 150 000 wird gefolgert, daß ein erheblich gesteigerter transkapillärer Ausstrom für Makromoleküle, d.h. Plasmaeiweiße vorlag.

Dies läßt auch auf einen erhöhten Flüssigkeitstransport im Interstitium der Tumoreschließen, da, wie bekannt, eine effiziente Lymphdrainage in Tumoren auszuschließen ist (Gullino, 1975; Peters et al., 1980). Aus diesem erhöhten Auswärtstransport von Makromolekülen wird auch gefolgert, daß eine weitere Erhöhung der Proteinkonzentration in der interstitiellen Flüssigkeit des Tumors vorlag, die zu einer weiteren Steigerung des hydrostatischen Druckes in diesem Kompartiment beitrug. Denn die Erhöhung des kolloidosmotischen Druckes in diesem Flüssigkeitsraum vermindert in zunehmendem Maße die Reabsorption von Flüssigkeit in die Gefäßlumina. Die Proteinkonzentrationen, die in der interstitiellen Flüssigkeit des Wirtsgewebes etwa 30 - 50 % betragen, werden damit um etwa 100 % überschritten (Gray et al., 1953; Eddy, 1980; Vaupel und Müller-Klieser, 1983). Mit der erhöhten Konzentration von Makromolekülen, d.h. mit der erhöhten Proteinkonzentration geht eine erhöhte Konzentration an Substanzen einher, für die die Plasmaeiweiße als Vehikel fungieren. Der entstehende erhöhte Flüssigkeitstransport im Interstitium muß als wesentlicher pathogenetischer Faktor in der Entstehung des Tumorrandödems und als wesentliche Ursache der hohen interstitiellen Drucke angesehen werden. Die erhöhten hydrostatischen Drucke im Interstitium sind neben den beschriebenen mikrozirkulatorischen Mechanismen ein weiterer Faktor zur Verminderung der Kapillardichte und damit zur Beeinträchtigung der nutritiven Durchblutung der Tumore (Wiig et al., 1981, 1982). Hinsichtlich der Diskussion der hohen interstitiellen Drucke auf die lokale Perfusion im Tumor, bzw. auf den Perfusionswiderstand darf auf die Analogien zum Kompartiment-Syndrom und die geringe Compliance des Tumorgewebes hingewiesen werden und auf die hierzu von WIIG ausgeführte Diskussion (Wiig et al., 1982).

Unter Berücksichtigung der Literatur läßt sich die Tumormikrozirkulation im frühen Wachstumsstadium des A-Mel-3 wie folgt charakterisieren:

Es zeigte sich frühzeitig eine chaotische Gefäßarchitektur mit Gefäßwand-aussackungen, Gefäßdurchmessersprüngen und erhöhten Kapillardurchmessern.

Im Verhältnis zur Tumorzellproliferation war die Gefäßneubildung ineffizient, dies galt insbesondere für die sekundäre Neoangiogenese. Zu diesen morphologischen Veränderungen kamen die strukturellen Veränderungen der Gefäßwand, die durch ein frühzeitiges Endothelödem und durch Endotheldefekte gekennzeichnet waren. Das ineffiziente Endothel bewirkte als Ausdruck eines physiologischen Reparatursmechanismus eine Thrombozytenaggregation an der Gefäßwand. In den Tumorgefäßen zeigte sich eine frühzeitige Verminderung der Blutzellgeschwindigkeit und ein Anstieg des Mikrohämatokrites. Die Gefäßdichte pro Gewebeeinheit nahm drastisch ab und der Anteil an nicht perfundierten Kapillaren nahm insbesondere im Tumorzentrum stark zu. Aufgrund der breiten Endothellücken kam es zu einer gesteigerten Permeabilität für Makromoleküle. Dies führte zu einem erhöhten Flüssigkeitsauswärtstransport in das Interstitium. Der kolloidosmotische Druck im Interstitium des Tumors stieg an. Aus diesem Grund und wegen des erhöhten transkapillären Flüssigkeitsverlustes wurde frühzeitig eine Hämokonzentration, d.h. ein außerordentlich hoher Mikrohämatokrit in den Tumorgefäßen gemessen. All diese Mechanismen trugen neben der Verlängerung der Gesamtfäßstrecken von den arteriolen zu den venösen Gefäßen zu einer erheblichen Steigerung des Perfusionswiderstandes bei. Der Perfusionsdruck reichte nicht aus, um diesen Widerstand zu überwinden, und es trat eine Verminderung der Anzahl an perfundierten Kapillaren auf, d.h. eine verminderte funktionelle Kapillardichte. Zur Verminderung der Kapillardichte trug weiterhin der hohe interstitielle Druck bei. Wegen des erhöhten Widerstandes im Tumorzentrum kam es zu einer Umverteilung der Tumordurchblutung zugunsten der Gefäße mit geringem Gefäßwiderstand und es wurde möglicherweise eine Shunt-Durchblutung erzeugt. Im Tumorzentrum zeigte sich frühzeitig eine Hypoxie, bzw. Anoxie und eine Azidose. Dies führte schließlich zur zentralen Tumorzellnekrose. Am Tumorrand konnten die Tumorzellproliferation und die Neoangiogenese unbehindert fortschreiten.

4. Mikrozirkulation im tumorumliegenden Gewebe im Frühstadium des Tumorwachstums

Dem tumorumliegenden Gewebe wurde bisher weder von klinischer noch von experimenteller Seite besondere Aufmerksamkeit geschenkt. Dies galt ebenso für den Bereich der Mikrozirkulation und deshalb lagen hierzu kaum Untersuchungen vor. Dies mußte umso mehr überraschen, da das versorgende und entsorgende Gefäßnetz des Tumors das umliegende tumorfreie Gewebe passiert und das Tumorwachstum in das umliegende Gewebe fortschreitet.

Die wenigen auch in der neueren Literatur vorzufindenden Berichte über das tumorumliegende Gewebe konzentrierten sich auf den Umbau des Gefäßsystems, bzw. auf die Neoangiogenese während der Inkorporierung in das Tumorgefäßnetz, sowie auf das peritumorale Ödem (Gabbert et al., 1987; Bartkowski, 1984). Die Pathophysiologie dieses peritumoralen Ödems steht insbesondere wegen der Parallelen zu dem vasogenen und zytotoxischen (Klatzo, 1967), bzw. interstitiellen Hirnödem (Fishman, 1975) im Mittelpunkt des Interesses (Bartkowski, 1984).

Als ein frühes Beispiel der Untersuchungen über den tumorumliegenden Bereich darf wiederum die Arbeit von DELARUE und Mitarbeitern angeführt werden (Delarue et al., 1963). Diese Arbeitsgruppe beschrieb, daß etwas "weiter entfernt vom Tumor" die Gefäße in der Hamsterbackentasche völlig normal seien. In diesen Untersuchungen wurden jedoch keine Angaben über die Entfernung vom Tumorgefäßsystem gemacht und es wurden auch keine hämodynamischen Studien durchgeführt. Die einzige Studie, die diskrete Hinweise auf die Hämodynamik im tumorumliegenden Gewebegab, war die Arbeit von CHAN et al. (Chan et al., 1984). Dort wurde beschrieben, daß die arteriolären Gefäße im Tumor keinen glatten Muskel mehr aufwiesen und deshalb auch nicht mehr fähig waren, auf Konstriktion oder Dilatation zu antworten. Es wurde daraus abgeleitet, daß durch die selektive Wirkung auf normale Gefäße die vasoaktiven Medikamente die "ratio" Tumor- zu Normalgewebe-Perfusion beeinflussen könnten. Insbesondere wurde ein Anstieg der "ratio" Normalgewebe

zu Tumor durch Vasodilatoren erwartet. Da diese Studien mit radioaktiv markierten Mikrosphaeren durchgeführt wurden, ließen sich jedoch keine exakten Rückschlüsse auf die Mikrohämodynamik im tumorumliegenden Gewebe ziehen. Vielmehr wurden die Effekte auf die Tumordurchblutung als Nebenwirkung der Veränderung der regionalen Organdurchblutung im Gesamtkreislauf interpretiert.

In der vorliegenden Arbeit wurden im tumorumliegenden Gewebe folgende Befunde erhoben:

Es sollte an dieser Stelle vorausgeschickt werden, daß die Tumorzellen in etwa 3 - 4 mm Entfernung vom definierten Bezirk des 'tumorumliegenden Gewebes' implantiert wurden. In den ersten Tagen des Tumorwachstums, d.h. bis etwa zum Tag 4 - 6 waren in allen Meßparametern keine signifikanten Veränderungen im tumorumliegenden Gewebe nachweisbar. Am Tag 8 zeigte sich erstmals eine signifikante Dilatation der Präkapillaren in diesem Areal. Weiterhin wurde in den Hautmuskelkapillaren häufig eine Flußumkehr beobachtet. Über kapilläre und postkapilläre Anastomosen fand eine Umkehr des Blutstroms zum Tumorgewebe hin statt. Dies war in mehr als 50 % der untersuchten Tiere vorzufinden. Dies ist so zu interpretieren, daß am Tag 8 das umliegende Gefäßsystem z.T. Versorgungsfunktion für den Tumor übernahm. Zu diesem Zeitpunkt lag das tumorumliegende Gewebe etwa 1,5 - 2 mm vom Tumorrand entfernt. Am Tag 12, an dem Teile dieses tumorumliegenden Areals in den Bereich des Tumorrandödems gerieten, waren deutliche Veränderungen nachzuweisen. Die präkapillären Gefäße waren signifikant dilatiert. Es konnte eine signifikante Flußzunahme in diesem Bereich nachgewiesen werden. Dies fand auch Ausdruck in der signifikanten Abnahme der Anzahl an nicht perfundierten Kapillaren um mehr als 100 % im Vergleich zum Kontrollwert. Hinzu kam eine signifikante Erweiterung postkapillärer und venolärer Gefäßsegmente. Zu diesem Zeitpunkt erfüllten diese venösen Gefäßsegmente häufig bereits Entsorgungsfunktion für den Tumor. Dies bedeutet, wenn das umliegende Gefäßsystem in den Bereich des Tumorrandödems kam, wurden von ihm sowohl Ver- als auch Entsorgungsaufgaben für den Tumor miterfüllt. Am Tag 8 wurde eine geringe Erhöhung des Mikrohämatokrites in den kapillären Gefäßen des tumorumliegenden Gewebes gemessen und am Tag 12 eine Ver-

breiterung des pO_2 -Histogramms. Hypoxische Werte konnten nicht nachgewiesen werden.

Anhand der elektronenmikroskopischen Aufnahmen vom Tag 7 wurde gezeigt, daß am Ort der Tumorzellimplantation keine quergestreiften Muskelfasern mehr vorhanden waren. Daraus ist zu schließen, daß zu einem früheren Zeitpunkt des Tumorwachstums die Muskelstränge durch proliferierende Tumorzellen auseinandergedrängt wurden und schließlich völlig durch die Tumorzellen ersetzt worden waren.

Zusammengefaßt lassen sich diese Ergebnisse im tumorumliegenden Gewebe damit wie folgt interpretieren. Bei ausreichender Entfernung zwischen Wirtsgewebe und Tumorgewebe befinden sich beide in einem Stadium einer sogenannten "friedlichen Koexistenz". Weder der Tumor, noch das tumorumliegende Gewebe beeinträchtigen sich gegenseitig. Mit fortschreitendem Tumorwachstum übernimmt das tumorumliegende Gefäßsystem zunächst Funktionsaufgaben für die Tumorversorgung, später Entsorgungsaufgaben. Anhand der histologischen Untersuchungen ist zu folgern, daß die proliferierenden Tumorzellen mit dem Wirtsgewebe um den Sauerstoff konkurrieren und den ortsständigen Muskelzellen den lebensnotwendigen Sauerstoff und weitere Nährstoffe entziehen. Schließlich wird der Hautmuskel völlig durch das Tumorzellsystem ersetzt und das ortsständige Gefäßsystem erfüllt nur noch Versorgungsfunktionen für den Tumor.

5. Erfassung des Antransportes fluoreszierender Substanzen - Ein Modell zur Überprüfung des Antransportes von Chemotherapeutika

Bereits anhand dieser wenigen Versuche konnte gezeigt werden, daß sich dieses Modell hervorragend dazu eignet, den Antransport, die Speicherung und den Abtransport von Fluorochromen zu verfolgen und quantitativ zu erfassen. Damit bietet dieses Modell die Möglichkeit kontinuierlich die Aufnahme und Abgabe von Substanzen in die Tumore im Vergleich zum jeweiligen umliegenden Gewebe zu verfolgen.

Dies war im vorliegenden Fall des Hämatoporphyrins von Bedeutung, da Hämatoporphyrin-Derivat nicht nur zur photodynamischen Therapie verwendet wird, sondern auch zur Lokalisation von an Organoberflächen lokalisierten Tumoren Anwendung finden soll (Hayata et al., 1984, Profio et al., 1983). Mit den in diesen Veröffentlichungen beschriebenen endoskopischen Systemen war es bisher jedoch nicht möglich, eine Subtraktion des fluoreszierenden Hintergrundes durchzuführen, sodaß eine selektive Anreicherung des Hämatoporphyrins im Tumor aufgrund hoher Hintergrundfluoreszenzen nur sehr schwer nachzuweisen war.

Mit dem hier vorgestellten System war es nicht nur möglich Kontraste zu verstärken oder zu vermindern, sondern durch die Subtraktion digitalisierter Bilder die Dynamik des Antransportes des HpD zu erfassen und regionale Unterschiede in dessen Verteilung sofort zu erkennen.

Auf die mit Hämatoporphyrin-Derivat in Zusammenhang stehenden tumorspezifischen Fragestellungen soll jedoch nicht näher eingegangen werden.

Die Elimination des Na^+ -Fluoreszeins innerhalb weniger Minuten und dessen rasche Anreicherung im Tumorrandödem waren eindrucksvoller Beweis für eine gesteigerte transkapilläre Nettofiltration und auch für den erhöhten Flüssigkeitstransport im Interstitium der Tumoren. Das Verhalten dieses Moleküls ist Bestätigung für die propagierte Steigerung der transkapillären Filtration und für die gemessene Hämokonzentration in den einzelnen Tumorgefäßsegmenten, die Ausdruck in einer Steigerung des Mikrohämatokrites fand.

Weitere derzeit noch nicht abgeschlossene Untersuchungen mit FITC-Dextran verschiedener Molekülgrößen zeigten, daß die einzelnen Moleküle unterschiedlich in den Tumoren angereichert wurden und auch in unterschiedlicher Geschwindigkeit aus den Tumoren abtransportiert wurden. Es ergaben sich Hinweise darauf, daß sich FITC-Dextran 150.000 wesentlich stärker im Tumor als im tumorumliegenden Gewebe anreichert. Dies hat unmittelbare Bedeutung für die Tumorthherapie. Zu ähnlichen Schlußfolgerungen gelangten MATSUMURA und MAEDA, die die Konzentration von Proteinen verschiedener Molekülgrößen im Tumor und in Normalgeweben untersuchten. Nachteil dieser Arbeit war jedoch, daß die einzelnen Proteine mit Chrom markiert und die Tumore unmittelbar nach Injektion entnommen werden mußten. Eine Kinetik der einzelnen Substanzen, wie im Rahmen dieser Arbeit dargestellt, konnte somit nicht gemessen werden (Maeda et al., 1984; Matsumura und Maeda, 1986).

Die selektive Darstellung des Tumors mit Hilfe der Doppel-Indikator-Technik und der nachfolgenden digitalen Bildsubtraktion ist völlig neu. Vergleichbare Untersuchungen in der Literatur fanden sich dazu nicht. Bisher wurden Bildsubtraktionssysteme lediglich in der Radiologie und im Bereich der Angiologie eingesetzt, um, z.B., Gefäßverschlüsse nachzuweisen. Die hier dargestellte Methodik zeigt, daß es mit zwei unterschiedlichen Indikatoren, die unterschiedliches Anreicherungsverhalten im Tumor und im umliegenden Gewebe besitzen, möglich ist, Tumore selektiv darzustellen. Voraussetzung hierzu ist jedoch, daß sich die beiden Fluorochrome in ihrem Emissionsspektrum unterscheiden und nicht überlappen. Für die Verbesserung einer radiologischen Diagnostik würde dies bedeuten, daß beispielsweise in einer Sitzung zwei unterschiedliche, intravasal verabreichbare Marker verwendet werden müssen, die mit zwei unterschiedlichen Detektionssystemen, z.B. Szintigraphie und Computertomographie erfaßt werden müssen. Unabdingbare Voraussetzung für eine optimale Darstellung wäre weiterhin, daß der interessierende Fokus wegen der nachfolgenden digitalen Bildsubtraktionen völlig immobilisiert werden kann. Diese Untersuchungen könnten als weiterer Schritt in Richtung des im American Journal of Röntgenology skizzierten "Total digital radiology department" interpretiert werden (Seeley, 1987).

6. Klinische Bedeutung der Meßergebnisse

Die neu entwickelte Kammerpräparation, adaptiert an die Rückenhaut Syrischer Goldhamster bietet sich - dies wurde in einigen Untersuchungen bereits gezeigt - für klinisch ausgerichtete Fragestellungen im Bereich der Mikrozirkulation an. Der besondere Vorteil dieses Modells besteht darin, daß das Tier hier nicht narkotisiert werden muß. Dies bedeutet, daß die Wirkungen vasoaktiver Pharmaka auf die Mikrozirkulation unbeeinträchtigt von Narkoseeffekten untersucht werden können. Darüberhinaus bietet dieses Modell die Vorzüge, lokale Durchblutungseffekte der Anästhetika im Vergleich zum Wachzustand zu untersuchen. Einige Untersuchungen aus dem Institut für Chirurgische Forschung, bzw. aus anderen Labors wurden bereits vorgelegt. Bisher wurden in diesen Kammerpräparationen die Einflüsse der Inhalationsanästhetika Enflurane, Isoflurane und Halothane auf die Mikrozirkulation untersucht, sowie die Wirkung vasoaktiver Substanzen, z.B. Isoproterenol, Pentolamin, Leukotriene etc. (Franke et al., 1982a, 1982b; Jensen, 1983; Goetz, 1987a, 1987b). Darüberhinaus wurden Untersuchungen über die spontane arterioläre Vasomotion durchgeführt (Colantuoni, 1982; Intaglietta u. Messmer, 1982; Funk, 1983a, 1983b; Colantuoni, 1984a, 1984b). Hierbei wurde aus dem Fehlen einer spontanen arteriolen Vasomotion rückgeschlossen, daß es zu einem signifikanten Anstieg des peripheren Gefäßwiderstandes kommt. Dem wird u.a. eine pathogenetische Bedeutung in der Entstehung der Hypertension beigemessen. Eine besondere Rolle wird auch der Wiederherstellung der spontanen arteriolen Vasomotion bei der Verbesserung der nutritiven Durchblutung bei vorhandener arterieller Verschußkrankheit zugeschrieben. Darüberhinaus eignet sich das Modell auch zum Studium pathophysiologischer Phänomene, wie z.B. zur Untersuchung der Effekte von Stoßwellen auf die Mikrozirkulation (Brendel et al., 1987). Dies stellt ein kleines Spektrum der Fragestellungen dar, die mit dieser Hautmuskelmikrozirkulationspräparation bearbeitet werden können.

Die Kombination von Kammer- und Tumormodell erlaubt folgende Rückschlüsse:
Die Ergebnisse aus den Untersuchungen über die Tumormikrozirkulation des

amelanotischen Hamstermelanoms A-Mel-3 haben insofern unmittelbare klinische Bedeutung, als die spezifischen Eigenschaften der Tumormikrozirkulation sowohl bei der Diagnose als auch bei der Therapie von Malignomen bisher kaum Berücksichtigung fanden. Hierzu dürfen im folgenden einige Anmerkungen gemacht werden:

Wird beispielsweise eine systemische Chemotherapie durchgeführt, so werden damit bevorzugt die gut durchbluteten Organe, d.h. Herz, Gehirn und Niere, perfundiert. Der bereits minderdurchblutete Tumor erhält nur einen sehr geringen Anteil dieses Chemotherapeutikums. Um die Konzentration auf einen tumorwirksamen Plasmaspiegel anzuheben, muß deshalb eine hochdosierte Gabe des Chemotherapeutikums erfolgen, wobei die bekannten unerwünschten Nebenwirkungen auftreten. Wie könnte bei Einbeziehung der Erkenntnisse aus den vorliegenden Untersuchungen die Perfusion im Tumor verbessert werden? Geht man davon aus, daß im Tumor, wie gezeigt, eine Hämokonzentration vorliegt (Hämatokrit um 100 % gesteigert!), müßte darauf abgezielt werden, diese Hämokonzentration im Tumor zu beseitigen, um die Tumordurchblutung und damit den Antransport des Chemotherapeutikums zu verbessern. Daß die Durchblutung in der Tat durch eine isovolämische Hämodilution verbessert werden kann, wurde von ENDRICH an diesem Modell bereits nachgewiesen. Er konnte zeigen, daß es zu einer signifikanten Zunahme der Blutzellgeschwindigkeit und des Volumenflusses kommt, sowie zu einer Verbesserung des Gewebeoberflächen- pO_2 (Endrich, 1984). Wird also der durch die Viskositäts-erhöhung induzierte Anstieg des Strömungswiderstandes im Tumor reduziert, kommt es zu einer Perfusionsverbesserung in den Kapillargefäßen des Tumors.

In der vorliegenden Arbeit wurde auch gezeigt, daß es zu einer erhöhten Permeabilität für Makromoleküle aufgrund der Endothellücken in den Tumorkapillaren kommt. Andererseits konnte nachgewiesen werden, daß das Molekül Natrium-Fluoreszein (MW 376) rasch in den Tumor aufgenommen wird und bereits nach wenigen Minuten aus dem Tumor eliminiert ist. Wesentlich höhere Konzentrationen liegen in der Ödemzone des Tumors und im umliegenden interstitiellen Gewebe vor. Da die Mehrzahl aller derzeit Chemotherapeutika ein

Molekulargewicht von unter 2000 Dalton aufweist, ist zu vermuten, daß sie einem ähnlichen Transportmechanismus im Tumor unterliegen, wie das Na-Fluoreszein, sofern sie nicht sofort von bestimmten ortsständigen Zellen, möglicherweise Tumorzellen, metabolisiert werden.

Demgegenüber konnte eine Anreicherung des Hämatoporphyrinderivats mit Hilfe eines Bildverarbeitungssystems gezeigt werden.

Weitere Vorversuche legen die Vermutung nahe, daß das großmolekulare Dextran 150.000 sich ebenso stärker im Tumorgewebe anreichert.

Allein aufgrund dieser wenigen Vorversuche kann bereits jetzt abgeleitet werden, daß sich das Kammermodell zusammen mit einem Bildverarbeitungssystem sehr gut eignet, um zu überprüfen, welche Molekülgrößen eine tumorselektive Anreicherung zeigen, und sich damit am ehesten für eine effektive Chemotherapie anbieten.

Wenn ein Chemotherapeutikum an ein kleines fluoreszierendes Molekül, das keine Eigenwirkung zeigt, angekoppelt werden kann, wäre damit eine rasche Untersuchung der Pharmokokinetik einer Substanz im Tumor im Vergleich zum tumorumliegenden Gewebe möglich.

Aufmerksamkeit verdient auch das tumorumliegende Gewebe. Es liegen beispielsweise keine Untersuchungen über vasoaktive Pharmaka und deren Einfluß auf das tumorumliegende Gewebe vor. Bisher wurden meist nur systemische Applikationen von vasoaktiven Pharmaka durchgeführt. Daraus wurde bisher rückgeschlossen, daß das tumorversorgende Gefäßsystem maximal dilatiert ist und eine Verbesserung der Tumordurchblutung durch vasoaktive Pharmaka nicht erzielt werden kann. Es ist jedoch durchaus vorstellbar, daß durch eine selektive Beeinflussung des tumorumliegenden Gewebes, eine Umverteilung des Blutflusses zugunsten oder zu ungunsten des Tumors herbeigeführt werden kann (Chan et al., 1984). Dazu bietet sich am ehesten ein Tumormodell an, in dem die Gefäße direkt untersucht werden können.

Wegen seiner Funktion als Transportweg für eine Chemotherapie, der nur unzureichend die Funktion der Ver- und Entsorgung übernehmen kann und wegen seiner Eigenschaft einer unvollständig ausgebildeten Ultrastruktur sollte

auch dem Tumorgefäßsystem, insbesondere jedoch dem Endothel, Beachtung entgegengebracht werden. Aufgrund der unvollständig ausgebildeten Ultrastruktur ist eine erhöhte Vulnerabilität des Tumorgefäßsystems bedingt. Dies konnte gezeigt werden bei den Effekten von Hyperthermie (Scheid, 1961) und von Radiotherapie (Denekamp und Fowler, 1977; Sutherland und Franko, 1980), sowie bei der Photoradiotherapie mit Hämatorporphyrinderivat und unlängst in eigenen Untersuchungen bei Applikation von Schockwellen (Goetz et al., unveröffentlichte Ergebnisse).

Es ist deshalb nicht überraschend, daß der Therapie von Tumoren mit dem Ziel einen ischämischen Tod des Tumors zu erzeugen, zunehmend Aufmerksamkeit geschenkt wird (Denekamp, 1984). In diesem Zusammenhang kommt dem Gefäßendothel besondere Bedeutung als möglichem Angriffsort für eine Tumorthherapie zu. So ist beispielsweise bekannt, daß das Tumorgefäßendothel eine Proliferationsaktivität besitzt, die 20 - 200 Mal höher liegt als die des normalen Gefäßendothels (Denekamp, 1984). Darüber hinaus erfüllt das Gefäßendothel im Normalgewebe wichtige Funktionen unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen, z.B. metabolische Aufgaben bei der Schrankenfunktion zwischen Extra- und Intravascularraum, antithrombogene Funktion auf der luminalen Seite der Gefäßwand, eine wesentliche Beteiligung an der Regulation des Gefäßwiderstandes usw (Gerlach, 1985, 1986; Hammersen und Hammersen, 1985a). Derartige Eigenschaften des Endothels im Tumorgefäßsystem spielen möglicherweise in diagnostischer wie therapeutischer Hinsicht eine bedeutende Rolle.

Das vorliegende Modell könnte dazu benutzt werden, den Angriffsort Endothel direkt zu untersuchen.

Durch die neue Kombination des vorliegenden Modells mit einer Doppel-Indikator-Technik und digitaler Bildsubtraktion wurde eine selektive Tumordarstellung möglich. Dies bedeutet, daß dieses Modell auch für die Überprüfung von diagnostischen Konzepten geeignet ist.

V. ZUSAMMENFASSUNG UND SCHLUßFOLGERUNG

Die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit bestand darin, die Mikrozirkulation im Frühstadium des Tumorwachstums quantitativ zu analysieren. Hierzu war zunächst die Entwicklung eines neuen chronischen Mikrozirkulationsmodells nötig.

Es wurde ein neues transparentes Hautkammermodell an die Rückenhaut Syrischer Goldhamster adaptiert. In Pentobarbitalnarkose wurden Aluminiumhautkammern mit zentralem Sichtfenster in die leicht mobilisierbare Rückenhautfalte der Tiere implantiert und ein kreisrunder Hautlappen von 1 cm Durchmesser exzidiert. Der verbliebene Hautmuskel mit darunterliegender Cutis und Subcutis der kontralateralen Seite wurde durch ein transparentes Deckgläschen vor Austrocknung geschützt. Polyäthylendauerkatheter wurden in der Arteria carotis communis dextra und der Vena jugularis dextra plaziert. Postoperativ war keine traumainduzierte Neovaskularisation im Präparationsareal zu beobachten.

Nach 48-stündiger Erholung von Narkose und chirurgischem Eingriff wurden nur die Tiere in den Versuch einbezogen, die den Kriterien einer intakten Mikrozirkulation genügten. 63 Versuchstiere wurden untersucht.

Im Abstand von jeweils 2 Tagen wurde eine quantitative Analyse der Hautmuskelmikrozirkulation mittels intravitaler Videofluoreszenzmikroskopie, Fluoreszenzmakroskopie und Gewebeoberflächen- pO_2 -Messung über einen Zeitraum von 14 Tagen durchgeführt. Dies beinhaltete die Messung der Blutzellgeschwindigkeit, der Gefäßdurchmesser und des segmentalen Volumenflusses, des Erythrozytenflusses und des Mikrohämatokrites in den einzelnen Mikrogefäßen. Weiterhin wurden die Kapillardichte pro Gewebereinheit, die Kapillardichte erythrozytenperfundierter Kapillaren, der Anteil der Kapillaren, die nicht von Erythrozyten perfundiert wurden, die Kapillarlängen, die Kapillaroberfläche, die Permeabilität für Makromoleküle und der Gewebeoberflächen- pO_2 erfaßt. Simultan wurden die systemischen Drucke registriert und intermittierend die Blutgase analysiert. Neun Präparationen wurden histologisch und elektronenmikroskopisch untersucht.

In den Normalgewebspräparationen waren über den Meßzeitraum von 14 Tagen keine signifikanten Änderungen der mikrohäodynamischen Meßparameter nachzuweisen. Dies war Zeichen der Intaktheit und der Stabilität dieser Mikrozirkulationspräparation über diese relativ lange Versuchszeitspanne hinweg. Die elektronenmikroskopischen Befunde, die freundlicherweise Prof. Dr. F. Hammersen, Direktor des Anatomischen Instituts der Technischen Universität München, erhoben hat, bestätigten dies eindeutig. Die Aufnahmen zeigten, daß die Mastzellen nicht degranuliert waren und das Endothel des Mikrogefäßsystems intakt blieb. Es wurden, wie für Muskelgewebe typisch, Kapillaren vom kontinuierlichen Typ nachgewiesen. Die Hautmuskelstränge, die der quergestreiften Muskulatur zuzuordnen waren, sowie die Strukturen des subkutanen Fettgewebes waren über den Beobachtungszeitraum konstant und unverändert vorzufinden.

Der besondere Vorteil dieses neuen Modells gegenüber allen anderen Mikrozirkulationspräparationen lag darin, daß alle mikrohäodynamischen Messungen im Wachzustand erhoben werden konnten. Daraus ist abzuleiten, daß in diesem Modell die Mikrozirkulation des Hautmuskels über einen Zeitraum von mindestens 14 Tagen im quasi physiologischen Zustand untersucht und beobachtet werden kann. Damit eignet sich dieses Modell für die Untersuchung vasoaktiver Substanzen in ihrem Effekt auf die Muskeldurchblutung, besonders jedoch zur Erfassung der Wirkungen von Anästhetika auf die Mikrozirkulation, da die einzelnen Messungen im Vergleich zum Wachzustand erhoben werden können. Da das Deckgläschen vom Präparationsareal abgenommen werden kann, sind auch Gewebeimplantationen oder Implantationen von Tumorzellen möglich, sowie direkte Messungen im Kammerareal.

34 Syrischen Goldhamstern wurden am 2. postoperativen Tag Tumorzellen des amelanotischen Hamstermelanoms A-Mel-3 in das Präparationsareal der Kammer implantiert. Entstehung und Entwicklung des Tumors wurden durch tägliche photomakroskopische Aufnahmen dokumentiert. Das Versuchsprotokoll zur quantitativen Messung der Mikrozirkulation im A-Mel-3 entsprach dem der Kontrollgruppe.

Die wesentlichen Befunde ließen sich wie folgt zusammenfassen: Innerhalb von 48 Stunden war am Ort der Tumorzellimplantation eine Neovaskularisation zu beobachten, die von den Kapillaren und Postkapillaren des Wirtsgewebes ausging. 2 Tage später, Tag 4 nach Tumorzellimplantation, war ein eigenständiges und für das amelanotische Hamstermelanom A-Mel-3 typisches chaotisches Gefäßnetzwerk entstanden. Die neugebildeten Tumorkapillaren zeigten im Vergleich zum Wirtsgewebe einen erweiterten Gefäßdurchmesser, starke Gefäßdurchmessersprünge, die auf einer Gefäßstrecke von wenigen Mikrometern mehr als 100 % des Kapillarlumens betragen konnten, sowie aneurysmatische Gefäßwandaussackungen. Die Perfusion der Kapillargefäße war inhomogen. Alle Tumorgefäße waren zu diesem Zeitpunkt perfundiert. Im Vergleich zum Wirtsgewebe wurde eine signifikant höhere Gefäßdichte gemessen. Es war bereits eine ausgeprägte Vasodilatation der zuführenden arteriolen Gefäßsegmente, d.h. der Transversalarteriolen, der terminalen Arteriolen und der Präkapillaren nachzuweisen. Die Messungen des Gewebeoberflächen- pO_2 zeigten eine ausreichende O_2 -Versorgung des Tumors in dieser Wachstumsphase. Die erhöhte Permeabilität für Makromoleküle im Tumor war von einem Tumorrandödem begleitet. Mit dieser Permeabilitätssteigerung einher ging eine signifikante Erhöhung des kapillären Hämatokrites um 80 % im Vergleich zum Wirtsgewebe, d.h. bereits zu diesem Zeitpunkt war eine erhebliche Hämokonzentration in den Tumorgefäßen nachzuweisen. Dies ließ auf einen erhöhten Perfusionswiderstand im Tumorgefäßsystem schließen.

Als morphologisches Korrelat der erhöhten Permeabilität wurden Endothellücken in den ausdifferenzierten Tumorkapillaren vorgefunden. Offensichtlich als physiologischer Reparationsmechanismus der Endothelrisse wurde eine intravasale Thrombenbildung beobachtet. Diese Thromben waren in der Lage die Lumina der Tumorgefäße kurzzeitig völlig zu verschließen. Die Brüche in der Gefäßinnenwand, die Gefäßdurchmessersprünge auf kurzen Wegstrecken und die Endothelaussackungen, sowie die intravasale Thrombenbildung wurden als weitere Ursachen für die Erhöhung des Perfusionswiderstandes in den einzelnen Tumorgefäßen angesehen. Trotz der Inhomogenitäten in der Mikrohämodynamik innerhalb der einzelnen Gefäßsegmente konn-

te das Gefäßsystem am Tag 4 nach Tumorzellimplantation weitgehend als Einheit angesehen werden, da keine signifikanten Unterschiede zwischen Tumorzentrum und Tumorrand bestanden.

Zunehmend differierten an den folgenden Tagen die Meßwerte innerhalb des Tumors. Am Tag 8 zeigte sich bei einem Tumordurchmesser von etwa 5-6 mm im Tumorzentrum (Durchmesser: 2 mm) eine deutliche Verminderung der Kapillardichte. Dies war begleitet von einem erheblichen Anstieg der Anzahl an nicht-perfundierten Kapillaren, bei gleichzeitig signifikant verminderter Kapillarfließgeschwindigkeit. Der Mikrohämatokrit und die Permeabilität für Makromoleküle nahmen weiterhin deutlich zu. Es ist daher anzunehmen, daß vermehrt Proteine ins Interstitium gelangten und dort zu einer Erhöhung des kolloidosmotischen Druckes führten.

Bei gleichbleibendem segmentalen Volumenfluß und abnehmender Kapillardichte nahm die Gesamtperfusion im Tumorzentrum signifikant ab. Dementsprechend war im Tumorzentrum eine Gewebehypoxie bzw. -anoxie nachzuweisen. Vermutlich trug diese Gewebehypoxie durch die Erhöhung der Rigidität der Erythrozyten neben den o.e. Befunden zu einer Verstärkung der Blutviskosität und des Perfusionswiderstandes in den Kapillaren des Tumorzentrums bei.

Im Tumor waren bisweilen hämorrhagische Bezirke vorzufinden. Im elektronenmikroskopischen Bild wurden korrespondierend hierzu Durchtritte von einzelnen Erythrozyten durch das Gefäßendothel beobachtet. Es wurden auch Tumorzellen vorgefunden, die direkten Anschluß an das Gefäßlumen hatten und möglicherweise an dem Aufbau der Gefäßwand beteiligt waren. Im Vergleich zum Tumorzentrum blieb der Tumorrand nahezu unverändert perfundiert.

Weitere 4 Tage später, d.h. am Tag 12 nach Tumorzellimplantation war eine noch stärkere Dissoziation der mikrohämodynamischen Befunde zwischen Tumorrand und Tumorzentrum zu beobachten. Dementsprechend war am Tag 12 eine Verstärkung der Hypoxie im Tumorzentrum nachzuweisen, mit mehr als 50 % der gemessenen pO_2 -Werte im hypoxischen bzw. anoxischen Bereich.

URSACHEN DER GEWEBEHYPOXIE IM TUMORZENTRUM

INTRAVASAL:

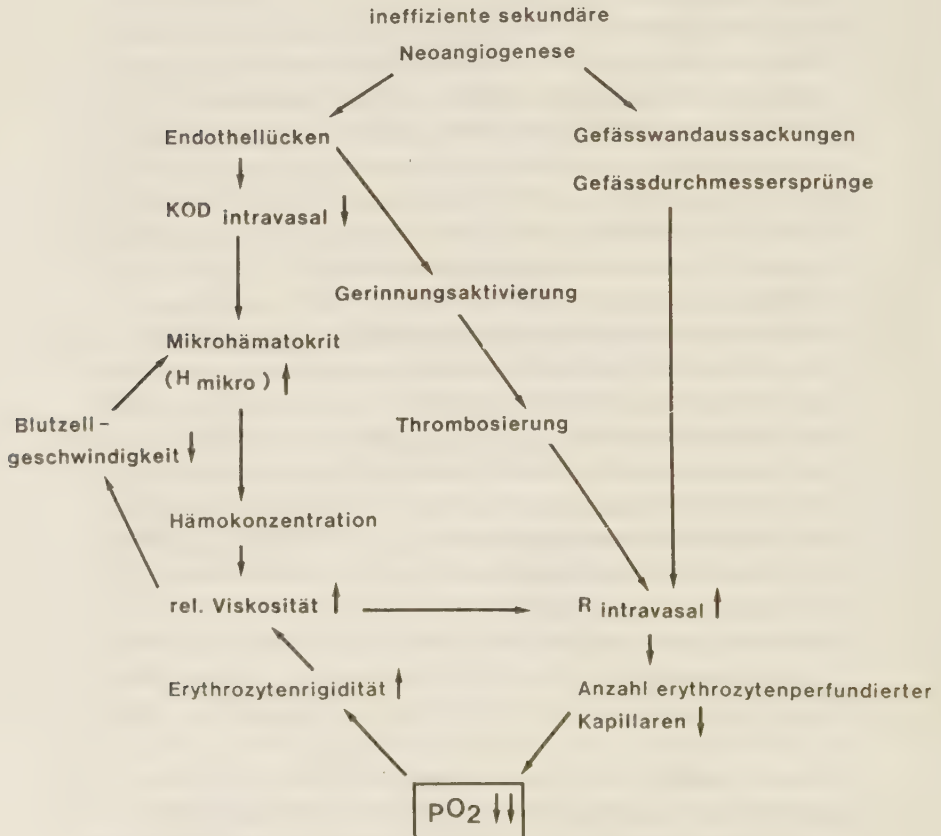


Abbildung 63:

URSACHEN DER GEWEBEHYPOXIE IM TUMORZENTRUM

EXTRAVASAL :

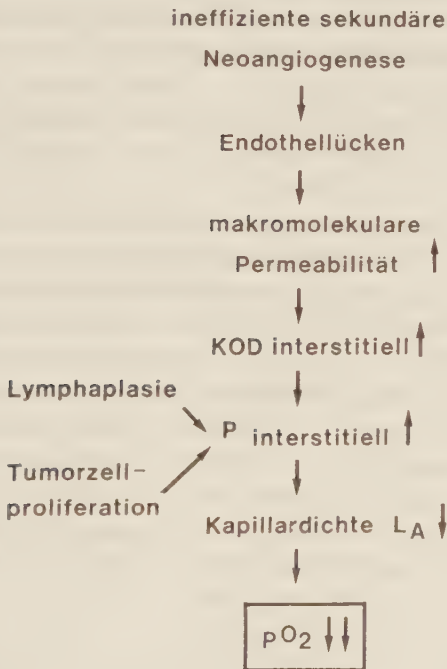


Abbildung 64:

Zugrundeliegende Ursache der Gewebehypoxie im Tumorzentrum war die elektronenmikroskopisch dokumentierte ineffiziente sekundäre Neoangiogenese mit den in den Abbildungen dargestellten Konsequenzen im Intra- und Extravasalraum, die in einer reduzierten Kapillardichte mit Verminderung der nutritiven Gewebepfusion und einem Anstieg des relativen Gefäßwiderstandes mündeten (Abbildung 63, 64). Dies hatte wiederum eine Reduktion der Kapillarperfusion und damit auch eine Verminderung der Anzahl an perfundierten Kapillaren zur Folge. Eine Umverteilung des angebotenen Blutes zugunsten von Gefäßen mit geringerem Perfusionswiderstand in peripheren Bezirken des Tumors ist deshalb sehr wahrscheinlich, da diese Tumorgefäße im Vergleich zum Tumorzentrum und im Vergleich zum Tag 4 eine signifikant erhöhte Durchblutung aufwiesen.

Erstmals wurde im Frühstadium des Tumorwachstums auch der tumorumliegende Bereich durch quantitative Mikrozirkulationsmessungen erfaßt. Es zeigten sich innerhalb der ersten 4 bis 8 Tage nur geringe Veränderungen im Vergleich zur Ursprungspräparation. Zu diesem Zeitpunkt betrug der Abstand zwischen Tumor und tumorumliegendem Gewebe etwa 3-4 mm. Am Tag 12 war teilweise eine Inkorporierung dieses Gefäßsystems in das Tumorrandareal zu beobachten. Sobald das Tumorrandödem an diesen Bereich heranreichte, war eine Erweiterung der Gefäßdurchmesser von Kapillaren und Postkapillaren festzustellen. Sproßbildungen aus diesen Gefäßen erfolgten innerhalb von 24 - 48 Stunden. Wie aus der Strömungsrichtung des Blutes in arteriolen und venolen Gefäßsegmenten zu entnehmen war, übernahm das Tumorrandareal dann Ver- und Entsorgungsaufgaben für den Tumor.

In weiteren Versuchen konnte gezeigt werden, daß sich dieses Modell auch für klinisch ausgerichtete Fragestellungen im Bereich der Tumormikrozirkulation eignet. Durch die Verwendung von zwei separat darstellbaren Fluoreszenzfarbstoffen und einer digitalen Bildsubtraktionsmethode konnte gezeigt werden, daß mit zwei sich gegensätzlich verhaltenden Fluoreszenzmarkern, einem speichernden Fluorochrom und einem Marker, der frühzeitig

aus dem Tumor abtransportiert wird, eine selektive und infinite Darstellung eines Tumorherdes möglich ist. Dies läßt sich möglicherweise auf radiologisch darstellbare Substanzen übertragen und damit zu einer verbesserten Tumordiagnose ausnützen.

Darüberhinaus konnte mit Hilfe der digitalen Bildverarbeitung und Fluoreszenzmikroskopie die Dynamik des Antransportes, die Verweildauer und die Verteilung von Fluorochromen im Tumor und im umliegenden Normalgewebe kontinuierlich an jeweils einem Tumor verfolgt werden. Dieses Vorgehen läßt sich zur Überprüfung der tumorspezifischen Pharmakokinetik verwenden.

Aus den vorliegenden Untersuchungen wird folgende Schlußfolgerung gezogen: Das Hautmuskelmikrozirkulationsmodell des Syrischen Goldhamsters eignet sich für eine Vielzahl mikrozirkulatorischer Untersuchungen im Wachstumsstand.

In Kombination mit dem Tumormodell des amelanotischen Hamstermelanoms A-Mel-3 kann es für klinische ausgerichtete, tumorspezifische Fragestellungen angewendet werden, und ist geeignet, neue therapeutische und diagnostische Wege und Möglichkeiten in der Onkologie aufzuzeigen. Das Tumormodell kann weiterhin dazu beitragen, Mechanismen im Bereich der Tumorthherapie aufzuklären.

VL LITERATUR

ABELL, R.G.:

The permeability of blood capillary sprouts and newly formed blood capillaries as compared to that of older blood capillaries.

Am. J. Physiol. 147: 237-241, 1946

ALGIRE, G.H.:

An adaption of the transparent-chamber technique to the mouse.

J. Natl. Cancer Inst. 4: 1-11, 1943

ALGIRE, G.H., CHALKLEY, H.W.:

Vascular reactions of normal and malignant tissues in vivo. I. Vascular reactions of mice to wounds and to normal and neoplastic transplants.

J. Natl. Cancer Inst. 6: 73-85, 1945

ALGIRE, G.H., LEGALLAIS, F.Y., PARK, H.D.:

Vascular reactions of normal and malignant tissues in vivo. II. The vascular reaction of normal and neoplastic tissues of mice to a bacterial polysaccharide from *Serratia Marcescens* (*Bacillus prodigius*) culture filtrates.

J. Natl. Cancer Inst. 8: 53-64, 1947

ALGIRE, G.H., LEGALLAIS, F.Y.:

Growth rate of transplantable tumor in relation to latent period and host vascular reaction.

Cancer Res. 7: 724-734, 1947

ALGIRE, G.H., LEGALLAIS, F.Y.:

Recent developments in the transparent chamber technique as adapted to the mouse.

J. Natl. Cancer Inst. 10: 225-253, 1949

ALGIRE, G.H., LEGALLAIS, F.Y.:

Vascular reactions of normal and malignant tissues in vivo. IV. The effect of peripheral hypotension on transplanted tumors.

J. Natl. Cancer Inst. 12: 399-419, 1951

ALGIRE, G.H.:

Determination of peripheral blood pressure in unanesthetized mice during microscopic observation of blood vessels.

J. Natl. Cancer Inst. 14: 865-877, 1954

ALGIRE, G.H., MERWIN, R.M.:

Vascular patterns in tissues and grafts within transparent chambers in mice.

Angiology 6: 311-318, 1955

ALTMAN, P.L., DITTMER, D.S.:

Biology Data Book, vol. 3, Bethesda, MD, Federation of the American Association for Experimental Biology, 1974

ALTSCHUL, R.:

Endothelium. Its development, morphology, function and pathology.

Mac Millan, New York, 1954

ALTURA, B.M., ALTURA, B.T., CARELLA, A., TURLAPATY, P.D.M.V., WEINBERG, J.:

Vascular smooth muscle and general anesthetics.

Fed. Proc. 39: 1584-1591, 1980

ANLIKER, M., CASTY, M., FRIEDLI, P., KUBLI, R., KELLER, H.:
Noninvasive Measurement of blood flow.

In: Hwang, N.H.C., Norman, N.A. (Eds.): "Cardiovascular Flow Dynamics and Measurements", pp. 43-88, University Park Press, Baltimore, 1977

APPELGREN, K.L.:

Methods of recording tumor blood flow.

In: Peterson, H.I. (Ed.): "Tumor Blood Circulation", pp. 87-101, CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, 1979

ARFORS, K.E., JONSSON, J.A., MCKENZIE, F.N.:

A titanium rabbit ear chamber: Assembly, insertion and results.
Microvasc. Res. 2: 516-519, 1970

ARFORS, K.E., BERGQVIST, D., INTAGLIETTA, M., WESTERGREN, B.:

Measurement of blood flow velocity in the microcirculation.

Uppsala J. med. Sci. 80: 27-33, 1975

ASAISHI, K., ENDRICH, B., GOETZ, A., MESSMER, K.:

Quantitative analysis of microvascular structure and function in the amelanotic melanoma A-Mel-3.

Cancer Res. 41: 1898-1905, 1981

ASANO, M., YOSHIDA, K., TATAI, K.:

Blood flow rate in the microcirculation as measured by photoelectric microscopy.

Bull. Inst. Pub. Health 13: 201-204, 1964

ASANO, M., BRANEMARK, P.I., CASTENHOLZ, A.:

A comparative study of continuous qualitative analysis of microcirculation in man.

Adv. Microcirc. 5: 1-31, 1973

AUSPRUNK D.H., FOLKMAN, J.:

Migration and proliferation of endothelial cells in preformed and newly formed blood vessels during tumor angiogenesis.

Microvasc. Res. 14: 53-65, 1977

BAEZ, S.:

Recording of microvascular dimensions with an image-splitter television microscope.

J. Appl. Physiol. 211: 299-301, 1966

BAGGE, U., BRANEMARK, R.I.:

White blood cell rheology.

Adv. Microcirc. 7: 1-17, 1977

BAKER, M., WAYLAND, H.:

On-line volumetric flow rate and velocity profile measurements for blood in microvessels.

Microvasc. Res. 7: 131-143, 1974

BALDINGER, V., FUNK, W., MESSMER, K.:

Effects of cristalloids and colloids on microcirculatory perfusion and tissue oxygenation (Abstr.).

Eur. surg. Res. 16: 65, 1984

BASLER, A.:

Über die Blutbewegung in den Kapillaren. 1. Mitteilung: Registrierung der Strömungsgeschwindigkeit.

Pflügers Arch. ges. Physiol. 171: 134-145, 1918

BASLER, A.:

Über die Blutbewegung in den Kapillaren. 2. Mitteilung: Beziehungen zwischen Strömungsgeschwindigkeit und Druck.

Pflügers Arch. ges. Physiol. 190: 212-221, 1921

BARTKOWSKI, H.M.:

Peritumoral edema.

Prog. exp. Tumor Res. 27: 179-190, 1984

BERGER, R., GOETZ A., CONZEN, P., BRENDDEL, W.:

FITC-markierte Erythrozyten: Verformbarkeit in-vitro und Rezirkulation in-vivo.
9. Jahrestagung der Gesellschaft f. Mikrozirkulation e.V., Kurzmanuskripte, S.
173-179, Berlin, 1985

BERMAN, H.J., LUTZ, B.R., FULTON, G.P.:

Blood pressure of golden hamster as affected by nembutal sodium and X-irradiation (Abstr.)
Am. J. Physiol. 183: 59, 1955a

BERMAN, H.J., LUTZ, B.R., FULTON, G.P.:

Indirect method for measuring blood pressure of the hamster (Abstr.).
Fed. Proc. 14 (1):12, 1955b

BERMAN, H.J., LUTZ, B.R., FULTON, G.P.:

Blood pressure in the golden hamster (*Mesocricetus auratus*) (Abstr.).
Fed. Proc. 15 (1): 17, 1956

BIERMAN, H.R., KELLY, K.H., DOD, K.S., BYRON, R.L., jr.:

Studies on the blood supply of tumors in man. I. Fluorescence of cutaneous lesions.
J. Natl. Cancer Inst. 11: 877-889, 1951

BIERMAN, H.R., KELLY, K.H., SINGER, C.:

Studies on the blood supply of tumors in man. IV. The increased oxygen content of venous blood draining neoplasms.
J. Natl. Cancer Inst. 12: 701-707, 1952

BJÖRK, J., HEDQVIST, P., ARFORS, K.E.:

Increase in vascular permeability induced by leukotriene B₄ and the role of polymorphonuclear leukocytes.
Inflammation 6: 189-200, 1982

BJÖRK, J., SMEDEGARD, G.:

The microvasculature of the hamster cheek pouch as a model for studying acute immune-complex-induced inflammatory reactions.

Int. Archs. Allergy appl. Immun. 74: 178-185, 1984

BLOCH, E.H.:

A quantitative study of the hemodynamics in the living microvascular system.

Am. J. Anat. 110: 125-153, 1962

BOND, R.F., BLACKARD, R.F., TAXIS, J.A.:

Evidence against oxygen being the primary factor governing autoregulation.

Am. J. Physiol. 216: 788-793, 1969

BORN, G.V.R., MELLING, A., WHITELOW, J.H.:

Laser Doppler microscope for blood velocity measurements.

Biorheology 15: 163-172, 1978

BRANEMARK, P.I.:

Intravascular anatomy of blood cells in man.

Adv. Microcirc. 1: 4-13, 1971

BRANEMARK, P.I., LINDSTROM, J.:

A modified rabbit's ear chamber. High-power high-resolution studies in regenerated and preformed tissues.

Anat. Rec. 145: 533-540, 1963

BRENDEL, W., DELIUS, M., GOETZ, A.:

Effect of shock waves on the microvasculature.

Prog. appl. Microcirc. 12: 81-93, 1987

BUGLIARELLO, G., HAYDEN, J.W.:

High-speed microcinematographic studies of blood flow in vitro.

Science 138: 981-983, 1962

BURTON, K.S., JOHNSON, P.C.:

Reactive hyperemia in individual capillaries of skeletal muscle.

Am. J. Physiol. 223: 517-524, 1972

BUTLER, T.P., GRANTHAM, F.H., FULLINO, P.M.:

Bulk transfer of fluid in the interstitial compartment of mammary tumors.

Cancer Res. 35: 3084-3088, 1975

BUTTL, P., INTAGLIETTA, M., REIMANN, H., HOLLINGER, C., BOLLINGER, A.,
ANLIKER, M.:

Capillary red blood cell velocity measurements in human nailfold by videosensitometric method.

Microvasc. Res. 10: 220-227, 1975

CARTER, S.K., GLATSTEIN, E., LIVINGSTON, R.:

Introduction: Cancer treatment and clinical research in perspective.

In: Carter, S.K., Glatstein, E., Livingston, R.B. (Eds.): "Principles of Cancer Treatment", pp. 3-13, McGraw-Hill Book Company, New York, 1982

CARTER, S.K. and LIVINGSTON, R.:

Principles of cancer chemotherapy.

In: Carter, S.K., Glatstein, E., Livingston, R.B. (Eds.): "Principles of Cancer Treatment", pp. 95-110, McGraw-Hill Book Company, New York, 1982

CASTENHOLZ, A.:

"Mikrokymographie" - ein Verfahren zur Registrierung von Bewegungsvorgängen im mikroskopischen Bereich.

Z. wiss. Mikroskopie mikr. Technik 68: 193-207, 1967

CATALAND, S., COHNEN C., SAPIRSTEIN, L.A.:

Relationship between size and perfusion rate of transplanted tumors.

J. Natl. Cancer Inst. 29: 389-394, 1962

CAVALLO, T., SADE, R., FOLKMAN, J.:

Ultrastructural autoradiographic studies of the early vasoproliferative response in tumor angiogenesis.

Am. J. Pathol. 70: 345-362, 1973

CHAN, R.C., BABBS, C.F., VETTER, R.J., LAMAR, C.H.:

Abnormal responses of tumor vasculature to vasoactive drugs.

J. Natl. Cancer Inst. 72: 145-150, 1984

CHANCE, B.:

Cellular oxygen requirements.

Fed. Proc. 16: 671-680, 1957

CHIEN, S., LIPOWSKY, H.H.:

Correlation of hemodynamics in macrocirculation and microcirculation.

Int. J. Microcirc. Clin. Exp. 1: 351-365, 1982

CLARK, E.R., KIRBY-SMITH, H.T., REX, R.O.:

Recent modifications in the method of studying living cells and tissues in transparent chambers inserted in the rabbit's ear.

Anat. Rec. 47: 187-211, 1930

CLARK, E.L.:

Observations on changes in blood vascular endothelium in the living animal.

Am. J. Anat. 57: 385-438, 1935

CLARK, E.T., CLARK, E.L.:

Microscopic observations on the growth of blood capillaries in the living mammal.

Am. J. Anat. 64: 251-301, 1939

CLARK, E.R.:

The transparent chamber technique for the microscopic study of living blood vessels.

Anat. Res. 120: 241-251, 1954

CLARK, L.C. jr.:

Monitor and control of blood and tissue oxygen tension.

Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs 2: 41-48, 1956

CLIFF, W.J.:

Observations on healing tissue: a combined light and electron microscopic investigation.

Phil. Trans. R. Soc. B. 246: 305-325, 1963

COBURN, R.F., MAYERS, L.B.:

Myoglobin O_2 tension determined from measurements of carboxymyoglobin in skeletal muscle.

Am. J. Physiol. 220: 66-74, 1971

COKELET, G.R.:

Experimental determination of the average hematocrit of blood flowing in a vessel.

Microvasc. Res. 7, 382-384 (1974)

COLANTUONI, A., BERTUGLIA, S., INTAGLIETTA, M., GROSS, J.F.:

Microangiodynamics in the artefact free microcirculation.

J. Microcir. Clin. Exp. 1: 265-278, 1982

COLANTUONI, A., BERTUGLIA, S., INTAGLIETTA, M.:

The effects of α - and β -adrenergic reception agonists and antagonists and calcium entry blockers on the spontaneous vasomotion.

Microvasc. Res. 28: 143-151, 1984a

COLANTUONI, A., BERTUGLIA, S., INTAGLIETTA, M.:

Quantitation of rhythmic diameter changes in arterial microcirculation.
Am. J. Physiol. 246: H508-517, 1984b

DAY, E.D., PLANINSEK, J.A., PRESSMAN, D.:

Localization of radio iodinated rat fibrinogen in transplanted rat tumors.
J. Natl. Cancer Inst. 23: 799-811, 1964

DELARUE, J., MIGNOT, J., CAULET, T.:

Modifications vasculaires de la poche jugale du hamster dore au dours du developpement de greffes d'une tumeur melanique.

C.R. Seances Soc. Biol. Paris 157: 69-83, 1963

DENEKAMP, J. and FOWLER, J.F.:

Cell proliferation kinetics and radiation therapy.

In: Becker, F.F. (Ed.): "Cancer, Vol. 6, A comprehensive treatise", pp. 101-137,
Plenum Press, New York, London, 1977

DENEKAMP, J.:

Vasculature as a target of tumor therapy.

Prog. appl. Microcirc. 4: 28-38, 1984.

DESAI, R.G.:

Experimental purpura and related hematological studies in the hamster (*Mesocricetus auratus*).

Dissertation, Boston Univ. Boston, Mass., Doctor Dissert. 22:123, 1955

EDDY, H.A., CASARETT, G.W.:

Development of the vascular system in the hamster malignant neurilemmoma.

Microvasc. Res. 6: 63-82, 1973

EDDY, H.A.:

Tumor vascular response following irradiation.

Microvasc. Res. 20: 195-211, 1980

EDDY, D.M.:

Secondary prevention of cancer: an overview.

Bulletin of the World Health Organization 64: 421-429, 1986

EDLICH, R.F., ROGERS, W., DE SHAZO, C.V. jr.:

Effect of vasoactive drugs on tissue blood in the hamster melanoma.

Cancer Res. 26: 1420-1424, 1966

EKELUND, L.:

Angiography and pharmacoangiography in human and experimental tumors.

In: Peterson, H.I. (Ed.): "Tumor Blood Circulation", pp. 185-201, CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, 1979

ELIAS, H., WEIBEL, E.R.:

Quantitative Methods in Morphology.

New York, Springer-Verlag, 1967

ENDRICH, B., INTAGLIETTA, M., REINHOLD, H.S., GROSS, J.F.:

Hemodynamic characteristics in microcirculatory blood channels during early tumor growth.

Cancer Res. 39: 17-23, 1979a

ENDRICH, B., REINHOLD, H.S., GROSS, J.F., INTAGLIETTA, M.:

Tissue perfusion inhomogeneity during early tumor growth in rats.

J. Natl. Cancer Inst. 62: 387-395, 1979b

ENDRICH, B., ZWEIFACH, B.W., REINHOLD, H.S., INTAGLIETTA, M.:
Quantitative studies on microcirculatory function in malignant tissue: Influence
of temperature on microvascular hemodynamics during the early growth of the BA
1112 rat sarcoma.

Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 5: 2021-2030, 1979c

ENDRICH, B., ASAISHI, K., GOETZ, A., MESSMER, K.:

Technical report. A new chamber technique for microvascular studies in unanesthetized hamsters.

Res. Exp. Med. 177: 125-134, 1980

ENDRICH, B., MESSMER, K.:

Microcirculation of transplanted tumors.

Drug Res. 31: 2007-2011, 1981

ENDRICH, B., GOETZ, A., MESSMER, K.:

Distribution of microflow and oxygen tension in hamster melanoma.

Int. J. Microcir. Clin. Exp. 1: 81-99, 1982a

ENDRICH, B., HAMMERSEN, F., GOETZ, A., MESSMER, K.:

Microcirculatory blood flow, capillary morphology and local oxygen pressure of the hamster amelanotic melanoma A-Mel-3.

J. Natl. Cancer Inst. 68: 475-485, 1982b

ENDRICH, B., LAPRELL-MOSCHNER, C., BRENDDEL, W., MESSMER, K.:

Effects of prolonged cold injury on the subcutaneous microcirculation of the hamster. I. Technique, morphology and tissue oxygenation.

Res. exp. Med. 181: 49-81, 1982c

ENDRICH, B.:

Mikrozirkulation maligner Tumoren. Effekte von Hämodilution und lokaler Hyperthermie im amelanotischen Melanom A-MEL-3 des Hamsters.

Habilitationsschrift, Heidelberg, 1984

ENGERMAN, R.L., PFAFFENBACH, D., DAVIS, M.D.:

Cell turnover of capillaries.

Lab. Invest. 17: 738-743, 1967

ERIKSSON, E., MYRHAGE, R.:

Microvascular dimensions and blood flow in skeletal muscle.

Acta Physiol. Scand. 86: 211-222, 1972

ERIKSSON, E., ZAREM, H.A.:

Growth and Differentiation of Blood vessels.

In: Kaley, G., Altura, B. (Eds.): "Microcirculation", Vol. I, pp. 339-420,
University Park Press, Baltimore, 1977

FABER, J.E., HARRIS, P.D., WIGMANN, D.L.:

Anesthetic depression of microcirculation, central hemodynamics and respiration
in decerebrate rats.

Am. J. Physiol. 243: H837-H843, 1982

FAHRAEUS, R.:

Die Strömungsverhältnisse und die Verteilung der Blutzellen im Gefäßsystem.

Klin. Wschr. 7: 100-106, 1928

FALK, P.:

Two methods for three-dimensional examination of the pattern of vasculature in
tumours.

Microvasc. Res. 15: 83-91, 1978

FENTON, B.M., ZWEIFACH, B.W., WORTHEN, D.M.:

Quantitative morphometry of conjunctival microcirculation in diabetes mellitus.

Microvasc. Res. 18: 153-166, 1979

FISHMAN, A.P.:

Brain edema.

N. Engl. J. Med. 293: 706-711, 1975

FOLKMAN, J., MERLER, E., ABERNATHY, C., WILLIAMS, G.:

Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis.

J. Exp. Med. 133: 275-288, 1971

FOLKMAN, J.:

Tumor angiogenesis.

In: Becker, F.F. (Ed.): "Cancer, Vol. 3, A comprehensive treatise", pp. 355-388, Plenum Press, New York, London, 1975

FOLKMAN, J., COTRAN, R.:

Relation of vascular proliferation to tumor growth.

Int. Rev. exp. Path. 16: 207-248, 1976

FOLKMAN, J.:

Tumor invasion and metastasis.

In: Holland, J.F. and Frei, E. (Eds.): "Cancer Medicine", pp. 167-177, Lea & Febiger, Philadelphia, 1982

FORTNER, J.G., MAHY, A.G., SCHRODT, G.R.:

Transplantable tumors of the Syrian (golden) hamster. Part I: Tumors of the alimentary tract, endocrine glands and melanomas.

Cancer Res.: 21: 161-198, 1961

FRANKE, N., ENDRICH, B., LAUBENTHAL, H., PETER, K., MESSMER, K.:

Einfluß von Pentobarbital auf die Mikrozirkulation von Skelettmuskulatur und Subkutis. Eine tierexperimentelle Studie.

Anaesth. Intensivther. Notfallmed. 17: 11-14, 1982

FRANKE, N., ENDRICH, B., MESSMER, K.:

Microcirculatory effects of halothane and enflurane.

In: Peter, K., Jesch, F. (Eds.): "Inhalation anaesthesia today and tomorrow."

Anesthesiology and Intensive Care Med. 150: 129-135, 1982

FRONEK, K., ZWEIFACH, B.W.:

Microvascular blood flow in cat tenuissimus muscle.

Microvasc. Res. 14: 181-189, 1977

FULTON, G.P.:

Microcirculation (Editorial)

Angiology 8: 102-104, 1957

FUNK, W., ENDRICH, B., MESSMER, K., INTAGLIETTA, M:

Spontaneous arteriolar vasomotion as a determinant of peripheral vascular resistance.

Int. J. Microcirc. Clin. Exp. 2: 11-25, 1983a

FUNK, W., INTAGLIETTA, M.:

Spontaneous arteriolar vasomotion.

Prog. appl. Microcirc. 3: 66-83, 1983b

GABBERT, H., WAGNER, R.:

Tumorzellproliferation und Tumervaskularisation experimentell erzeugter Dickdarmkarzinome während früher Wachstumsphasen.

Mikrozirk. Forsch. Klin. 2: 107-113, 1983

GABBERT, H., GERHARZ, C.D., RAMP, U., BOHL, J.:

The nature of host tissue destruction in tumor invasion.

Virchows Arch. 52: 513-527, 1987

GAEHTGENS, P.:

Hemodynamics of the microcirculation. Physiological characteristics of blood flow in the microvasculature.

In: Meesen, H. (Hrsg.): "Handbuch der Allgemeinen Pathologie, III/7, Mikrozirkulation", S. 231- 288, Springer-Verlag, Heidelberg, New York, 1977

GAEHTGENS, P.:

Mikrozirkulation

In: Busse, H. (Hrsg.): "Kreislaufphysiologie", S. 70-92, Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York, 1982

GAHM, T., REINHARDT, E.R., WITTE, S.:

Analysis of the wall permeability of blood vessels in the rat mesentery. Res. Exp. Med. 184: 1-15, 1984

GASTPAR, H.:

Inhibition of cancer cell stickiness by anticoagulants, fibrinolytic drugs and pyrimido-pyrimidine derivatives.

Hemat. Rev. 3: 1-51, 1972

GENTRY, R.M., JOHNSON, P.C.:

Reactive hyperemia in arterioles and capillaries of frog skeletal muscle following microocclusion.

Circ. Res. 26: 953-965, 1979

GERLACH, E.:

Einige neuere biochemische und physiologische Aspekte des Gefäßendothels (Abstr.).

Z. Kardiol. 75, Suppl. 3: 47, 1985

GERLACH, E., NEES, S., BECKER, B.F.:

The vascular endothelium: a survey of some newly evolving biochemical and physiological features.

Basic Res. Cardiol. 80: 459-474, 1985

GERLOWSKI, L.E., JAIN, R.K.:

Microvascular permeability of normal and neoplastic tissue.

Microvascular Res. 31: 288-305, 1986

GIMBRONE, M.A., COTRAN, R.S., LEAPMAN, S.B., FOLKMAN, J.:

Tumor growth and neovascularization: An experimental model using the rabbit cornea.

J. Natl. Cancer Inst. 52: 413-427, 1974

GOETZ, A., ENDRICH, B., LAPRELL, C., MEßMER, K.:

An experimental model for prolonged studies of the microcirculation.

Bibl. Anat. 20: 65-68, 1981

GOETZ, A., FEYH, J., SCHNECKENBURGER, H., CONZEN, P., JOCHAM, D., UNSOELD, E.:

Quantitative in-vivo measurement of Photofrin II in tumor- and tumor-free tissue.

In: G. Jori and C. Perria (Eds.): "Photodynamic therapy of tumors and other diseases", pp. 405-408, Libreria Progetto Editore, Padova, 1985

GOETZ, A., CONZEN, P., SCHMIDT, A., HOBHAHN, J., BRENDDEL, W.:

Microcirculatory effects of isoflurane (Abstr.).

Anesthesiology 65, A1, 1986a

GOETZ, A., HOBHAHN, J., CONZEN, J., HABAZETTL, H., PETER, K., BRENDDEL, W.:

The myocardial microcirculation during anesthesia with isoflurane and enflurane: evidence of shunt perfusion at the capillary level (Abstr.).

Anesthesiology 65, A262, 1986b.

GOETZ, A. SCHNECKENBURGER, H., FEYH, J., CONZEN, P., BRENDEL, W.:
Zeitaufgelöste Laserfluoreszenzmikroskopie von Hämatoporphyrin-Derivat (HpD) zur
Lokalisation an Oberflächen gelegener Tumore.
Langenbecks Arch. Chir. Suppl. Chir. Forum, 337-341, 1986c

GOETZ, A., DEININGER, F.D., CONZEN, P., BRENDEL, W.:
Effects of FPL 55712 on leukotriene C₄/leukotriene D₄-induced vasoconstriction
and macromolecular permeability.
In: Samuelson, B., Paoletti, R., Ramwell, P.W. (Eds.): "Advances in Prostaglan-
din, Thromboxane and Leukotriene Research, Vol. 17", pp. 651-656, Raven Press,
New York, 1987a

GOETZ, A., DEININGER, F.D., CONZEN, P., BRENDEL, W.:
Microcirculatory effects of LTC₄ and LTD₄ in the skin fold preparation of awake
hamsters.
Progr. appl. Microcirc. 12: 307-315, 1987b

GOETZ, A., FEYH, J., ORTNER, H., CONZEN, P., BRENDEL, W.:
Digital on-line subtraction on videomicroscopic images for detection of hemato-
porphyrin-derivative fluorescence (Abstr.).
Int. J. Microcirc. Clin. Exp. 6: 71, 1987c

GOLDACRE, R.J., SYLVEN, B.:
On the access of blood-borne dyes to various tumour regions.
Br. J. Cancer 16: 306-315, 1962

GOLDMANN, E.:
Growth of malignant disease in man and the lower animals with special reference
to vascular system.
Proc. R. Soc. Med. 1: 1-22, 1907

GOODALL, C.M., SANDERS, A.G. SHUBIK, P.:

Studies of vascular patterns in living tumors with transparent chamber inserted in hamster cheek pouch.

J. Natl. Cancer Inst. 35: 497-521, 1965

GOODMAN, A.H., GUYTON, A.C.:

A system for measuring capillary red cell velocity.

Fed. Proc. 32: 323-328, 1973

GOODMAN, A.H., GUYTON, A.C., DRAKE, R., LOFLIN, J.H.:

A television method for measuring capillary red cell velocities.

J. Appl. Physiol. 37: 126-130, 1974

GORCZYNSKI, R.J., KLITZMAN, B., DULING, B.R.:

Interrelations between contracting striated muscle and precapillary microvessels.

Am. J. Physiol. 235: H494-H504, 1978

GOSALVEZ, M., THURMAN, R.G., CHANCE, B., REINHOLD, M.S.:

Regional variation in the oxygenation of mouse mammary tumors in vivo demonstrated by fluorescence of pyridine nucleotide.

Br. J. Radiol. 45: 510-517, 1972a

GOSALVEZ, M., THURMAN, R.G., CHANCE, B., REINHOLD, M.S.:

Indication of hypoxic areas in tumors from in vivo NADH fluorescence.

Europ. J. Cancer 267-269, 1972b

GRANT, L.:

The sticking and emigration of white blood cells in inflammation.

In: Zweifach, B.W., Grant, L., McCluskey, R.T., (Eds.): "The inflammatory Process", Vol. 2, pp. 205-249, Academic Press, New York, 1973

GRAY, L.H., CONGER, A.D., EBERT, M., HORNSEY, S., SCOTT, O.C.A.:
The concentration of oxygen dissolved in tissues at the time of irradiation as a
factor in radiotherapy.
Br. J. Radiol. 26: 638-648, 1953

GREENBLATT, M., CHOUDARI, K., SANDERS, A., SHUBIK, P:
Mammalian microcirculation in the living animal: Methodologic considerations.
Microvasc. Res. 1: 420-432, 1969

GULLINO, P.M., GRANTHAM, F.H.:
Studies on the exchange of fluids between host and tumor. II. The blood flow of
hepatomas and other tumors in rats and mice.
J. Natl. Cancer Inst. 27: 1465-1491, 1961

GULLINO, P.M., GRANTHAM, F.H., CLARK, S.H.:
The collagen content of transplanted tumors.
Cancer Res. 22: 1031-1039, 1962

GULLINO, P.M., CLARK, S.H., GRANTHAM, G.H.:
The interstitial fluid of solid tumors.
Cancer Res. 24: 780-797, 1964

GULLINO, P.M.:
Extracellular compartments of solid tumors.
In: Becker, F.F. (Ed.): "Cancer, Vol. 5, A comprehensive treatise", pp. 327-354,
Plenum Press, New York, 1975

HAMMERSEN, F.:
Bau und Funktion der Blutkapillaren.
In: Meesen (Hrsg.): "Handb. d. allgem. Pathol., III/7, Mikrozirkulation", S.
135-230, Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 1977

HAMMERSEN, F.:

Musterbildung und Struktur der terminalen Strombahn.

In: Meßmer, K., Fagrell, B. (Hrsg.): "Mikrozirkulation und arterielle Verschußkrankheiten", S. 10-21, Karger, Basel, 1981

HAMMERSEN, F., HAMMERSEN, E., OSTERKAMP-BAUST, U.:

Structure and function of the endothelial cell. An introduction. Progr. appl. Microcirc. 1: 1-16, 1982

HAMMERSEN, F., OSTERKAMP-BAUST, U., ENDRICH, B.:

Ein Beitrag zum Feinbau terminaler Strombahnen und ihrer Entstehung in bösartigen Tumoren.

Mikrozirk. Forsch. Klin. Z: 15-51, 1983

HAMMERSEN, F., HAMMERSEN, E.:

Das Endothel - ein disseminierte metabolisch aktives Organ.

In: Meßmer, K. (Hrsg.): "Angiodynamik und Angiopathie", S. 15-29, Zuckschwerdt Verlag, München-Bern-Wien, 1985a

HAMMERSEN, F., HAMMERSEN, E.:

Zur Morphologie von Gefäßnetzwerken in der Mikrozirkulation. 9. Jahrestagung der Gesellschaft für Mikrozirkulation e.V., Kurzmanuskripte, S. 1-7, Berlin, 1985b

HAMMERSEN, F., ENDRICH, B., MEßMER, K.:

The fine structure of tumor blood vessels.

Int. J. Microcirc. Clin. Exp. 4: 31-43, 1985

HANLEY, J.A.:

Evaluating primary prevention programmes against cancer.

Bulletin of the World Health Organization, 64: 311-320, 1986

HARPER, S.L., BOHLEN, H.G.:

In vitro and in vivo measurement of red cell velocity with epi- and transillumination.

Microvasc. Res. 25: 186-193, 1983

HARRIS, P.D., RANDALL, J.E., NICOLL, P.A.:

Detection of erythrocytes passing through capillaries by a photocell-computer technique.

J. appl. Physiol. 24: 728-732, 1968

HAYATA, Y., KATO, H., KONAKA, C., ONO, J., TAKIZAWA, N.:

Hematoporphyrin derivative and laser photoradiation in the treatment of lung cancer.

Chest 81: 269-277, 1982

HELLMAN, S., DeVITA, V.T. jr.:

Principles of cancer biology: Kinetics of cellular proliferation.

In: DeVita V.T.Jr., Hellman, S., Rosenberg, S.A. (Eds.): "Cancer: Principles and practice of oncology", pp. 73-79, J.B. Lippincott, Philadelphia, Toronto, 1982

HERRMANN, K.S.:

Platelet aggregation induced in the hamster cheek pouch by a photochemical process with excited fluorescein isothiocyanate-dextran.

Microvasc. Res. 26: 238-249, 1983

HEYMANN, M.A., PAYNE, B.D., HOFFMAN, J.I.E., RUDOLPH, A.M.:

Blood flow measurements with radionuclide-labeled particles.

Prog. Cardiovasc. Dis. 20: 55-67, 1977

HIRST, D.G., DENEKAMP, J., HOBSON, B.:

Proliferation kinetics of endothelial and tumour cells in three mouse mammary carcinomas.

Cell Tiss. Kinet. 15: 251-262, 1982

HOLDENER, E.E.:

Grundlagen der medikamentösen Krebstherapie.

In: Brunner, K.W. und Nagel, G.A. (Hrsg.): "Internistische Krebstherapie", S. 75-91, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo, 1985

HOLLIGER, C., ANLIKER, M., KLINGLER, D., BOLLINGER, A.:

Evaluation of an on-line videodensitometric measurement of the red blood cell velocity in the capillaries of the human nailfold.

Biomed. Technol. 20: 187-192, 1975

HONIG, C.R., FRIERSON, J.L., NELSON, C.N.:

O₂ transport and VO₂ in resting muscle: Significance for tissue-capillary exchange.

Am. J. Physiol. 220: 357-363, 1971

HORIMOTO, M., KOYAMA, T., MISHINA, H., ASAKURA, T., MURAO, M.:

Blood flow velocity in pulmonary microvessels of bullfrog.

Respir. Physiol. 37: 45-59, 1979

HOUSE, E.L., PANSKY, B., JACOBS, M.S.:

Age changes in blood of the golden hamster.

Amer. J. Physiol. 200:1018-1022, 1961

HÜNIG, R., METZGER, U., ORBRECHT, J.P.:

Grundsätze der interdisziplinären Krebstherapie.

In: Brunner, K.W. und Nagel, G.A. (Hrsg.): "Internistische Krebstherapie", S. 119-140, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo, 1985

HÜRTHLE, K.:

Eine Methode zur Registrierung der Geschwindigkeit des Blutstroms in den kapillaren Gefäßen.

Pflügers Arch. ges. Physiol. 162: 422-431, 1915

HULTSTRÖM, D., SVENSJÖ, E.:

Simultaneous fluorescence and electron microscopical detection of bradykinin induced macromolecular leakage.

Bibl. Anat. 15: 466-468, 1977

HULTSTRÖM, D.:

FITC dextrans in neurobiological research. Thesis.

Acta Univ. Upsali 438, 1982

IDE, A.G., BAKER, N.H., WARREN, S.L.:

Vascularization of the Brown-Pearce rabbit epithelioma transplant as seen in the transparent ear chamber.

Am. J. Roentgenol. 42: 891-899, 1939

INTAGLIETTA, M., TOMPKINS, W.R., RICHARDSON, D.R.:

Velocity measurements in the microcirculation of the cat omentum by on-line method.

Microvasc. Res. 2: 462-473, 1970

INTAGLIETTA, M., TOMPKINS, W.R.:

System for the measurement of velocity of microscopic particles in liquids.

IEEE Trans. Biomed. Eng., 18: 376-377, 1971

INTAGLIETTA, M., TOMPKINS, W.R.:

On-line microvascular blood cell flow velocity measurement by simplified correlation technique.

Microvasc. Res. 4: 217-220, 1972a

INTAGLIETTA, M., TOMPKINS, W.R.:

On-line measurement of microvascular dimensions by television microscopy.

J. Appl. Physiol. 32: 546, 1972b

INTAGLIETTA, M., TOMPKINS, W.R.:

Microvascular measurements by video image shearing and splitting.

Microvasc. Res. 5: 309-312, 1973

INTAGLIETTA, M., ZWEIFACH, B.W.:

Microcirculatory basis of fluid exchange.

Adv. Biol. Med. Phys. 15: 111-159, 1974

INTAGLIETTA, M., SILVERMAN, N.R., TOMPKINS, W.R.:

Capillary flow velocity measurements in vivo and in situ by television method.

Microvasc. Res. 10: 165-179, 1975

INTAGLIETTA, M., MYERS, R.R., GROSS, J.F., REINHOLD, H.D.:

Dynamics of microvascular flow in implanted mouse mammary tumours.

Bibl. Anat. 15: 273-276, 1977

INTAGLIETTA, M., MESSMER, K.:

Microangiodynamics, peripheral vascular resistance and the normal microcirculation.

Int. J. Microcirc. Clin. Exp. 2: 3-10, 1983

JENDRUCKO, R.J., LEE, J.S.:

The measurement of hematocrit of blood flowing in glass capillaries by microphotometry.

Microvasc. Res. 6: 316-331, 1973

JENSEN, U., ENDRICH, B., FISCHER, E., GÖTZ, A., MESSMER, K.:

Local PO_2 and microvascular hemodynamics in the dorsal skin of hamsters during systemic administration of isoproterenol (Abstr.).

Microvasc. Res. 26: 135, 1983

JOHNSON, P.C.:

Measurement of microvascular dimensions in vivo.

J. appl. Physiol. 23: 593-596, 1967

JOHNSON, P.C., WAYLAND, H.:

Regulation of blood flow in single capillaries.

Amer. J. Physiol. 212: 1405-1415, 1967

JOHNSON, P.C.:

Red cell separation in the mesenteric capillary network.

Am. J. Physiol. 221: 99-104, 1971

JOHNSON, P.C.:

Photometric scanning techniques for measurement of blood vessel dimensions. Microvasc. Res. 5: 292-298, 1973

JOHNSON, P.C., BLASCHKE, J., BENTON, K.S., DIAL, J.H.:

Influence of flow variations on capillary hematocrit in the mesentery.

Amer. J. Physiol. 221: 105-112, 1973

JOHNSON, P.C., BURTON, K.S., HENRICH, H., HENRICH, U.:

Effect of occlusion duration on reactive hyperemia in sartorius muscle capillaries.

Am. J. Physiol. 230: 715-719, 1976

JONES, C.E., CROWELL, J.W., SMITH, E.E.:

Determination of mean tissue oxygen tensions by implanted perforated capsules.

J. Appl. Physiol. 26: 630-633, 1969

KANZOW, G., PRIES, A.R., GAEHTGENS, P.:

Analysis of the hematocrit distribution in the mesenteric microcirculation.

Int. J. Microcirc. Clin. Exp. 1: 67-79, 1982

KARLSSON, L., ALPSTEN, K.L., PETERSON, H.-I.:

Intratumor distribution of vascular and extravascular spaces.

Microvasc. Res. 19: 71-79, 1980

KESSEL, D.:

Porphyrin localization: A new modality for detection and therapy of tumors.

Biochem. Pharmacol. 33: 1389-1393, 1984

KESSLER, M., LÜBBERS, D.W.:

Aufbau und Anwendungsmöglichkeiten verschiedener PO_2 -Elektroden.

Pflügers Arch. ges. Physiol. 291: R82, 1966

KESSLER, M., GRUNEWALD, W.:

Possibilities of measuring oxygen pressure fields in tissue by multiwire platinum electrodes.

Prog. Resp. Res. 3: 147-152, 1969

KESSLER, M.:

Problems with the use of platinum cathodes for the polarographic measurement of oxygen.

In: Kessler, M., Bruley, D.F., Clark, L.C., Luebbers, D.W., Silver, I.A., Strauss, J. (Eds.): "Oxygen Supply", pp. 81-85, Urban Schwarzenberg, Munich, 1973

KESSLER, M., GÖRNANDT, L., LANG, H.:

Correlation between oxygen tension in tissue and hemoglobin dissociation curve

In: Kessler, M., Bruley, D.F., Clark, L.C., Luebbers, D.W., Silver, I.A., Strauss, J. (Eds.): "Oxygen Supply", pp. 156-159, Urban Schwarzenberg, München Berlin, Vienna, 1973

KESSLER, M., HOEPER, J., KRUMME, B.A.:

Monitoring of tissue perfusion and cellular function.

Anesthesiology 45: 184-197, 1976

KESSLER, M., HÖPER, J., LÜBBERS, D., JI, S.:

Local factors affecting regulation of microflow, O_2 uptake and energy metabolism.

In: Kovach, A.G.B., Dora, E., Kessler, M., Silver, J.A. (Eds.): Adv. Physiol. Sci. Vol. 25, "Oxygen Transport to tissue", pp. 155-181, Pergamon Press, 1981

KESSLER, M., HARRISON, D.K., HÖPER, J.:

Tissue oxygen measurement techniques.

In: Baker, C.H., Nastuk, W.L. (Eds.): "Microcirculatory technology", pp. 390-425, Academic Press, New York, 1986

KJARTANSSON, I.E., APPELGREN, L., PETERSON, H.L.:

Capillary blood flow, exchange and flow distribution in two transplantable rat tumors. Studies on the early effect of x-ray irradiation.

Bibl. Anat. 12: 519-526, 1973

KJARTANSSON, J.:

Tumor circulation. An experimental study in the rat with a comparison of different methods for estimation of tumor blood flow.

Acta chir. scand. (Suppl.) 471: 1-74, 1976

KLABUNDE, R.E., JOHNSON, P.C.:

Capillary velocity and tissue pO_2 changes during reactive hyperemia in skeletal muscle.

Amer. J. Physiol. 233: 379-383, 1977

KLATZO, I.:

Neuropathological aspects of brain edema.

J. Neuropath. exp. Neurol. 26:1-14, 1967

KLIGERMAN, M.M., HENEL, D.K.:

Some aspects of the microcirculation of a transplantable experimental tumor.

Radiology 76: 810-817, 1961

KLITZMAN, B., DULING, B. R.:

Microvascular hematocrit and red cell flow in resting and contracting striated muscle.

Am. J. Physiol. 237: H481-H490, 1979

KOLMOGOROV, A.:

Confidence limits for an unknown distribution function.

Ann. Math. Statist. 12: 461-463, 1941

KOYAMA, T., HORIMOTO, M., MISHINA, H., ASAKURA, T., HORIMOTO, M.,
MURAO, M.:

Laser doppler microscope in an oblique-backwarde mode and pulsatile blood flow velocity in pulmonary arteriole.

Experientia 35: 65-67, 1979

KROGH, A.:

The supply of oxygen to the tissues and the regulation of the capillary circulation.

J. Physiol. (Lond.) 57: 457-473, 1919

KROGH, A.:

Anatomy and physiology of capillaries.

Yale Univ. Press, New Haven, 1922

KUNZE, K.:

Die lokale, kontinuierliche Sauerstoffdruckmessung in der menschlichen Muskulatur.

Pfluegers Arch. ges. Physiol. 292: 151-161, 1966

LAMB, T.W.:

Tissue gas tensions during methemoglobinemia.

J. Appl. Physiol. 21: 858-864, 1966

LEAF, N., ZAREM, H.A.:

Construction and use of a miniaturized rabbit ear chamber.

Microvasc. Res. 2: 77-85, 1970

LEE, Y.T.:

Diagnosis, treatment and prognosis of early melanoma.

Ann. Surg. 191: 87-97, 1980

LEE, T.Q., SCHMID-SCHÖNBEIN, G.W., ZWEIFACH, B.W.:

The application of an improved dual-slit photometric analyzer for volumetric flow rate measurements in microvessels.

Microvasc. Res. 26: 351-361, 1983

LENIGER-FOLLERT, E., LÜBBERS, D.W., WRABETZ, W.:

Regulation of focal tissue PO_2 of the brain cortex at different arterial O_2 pressures.

Pflügers Arch. 359: 81-94, 1975

LEWIS, W.H.:

The vascular pattern of tumors.

J. Hopkins Hosp. Bull. 41: 156-171, 1927

LEY, K., ARFORS, K.-E.:

Changes in macromolecular permeability by intravascular generation of oxygen-derived free radicals.

Microvasc. Res. 24: 25-33, 1982

LEY, K., SCHÜMANN, K., HENRICH, H.:

Microvascular permeability and blood flow in atrial homografts in the Hamster cheek pouch

Int. J. Microcirc. Clin. Exp. 3: 29-39, 1984

LEY, K., PRIES, A.R., GAEHTGENS, P.:

Verteilung von Erythrozyten an Mikrogefäßverzweigungen durch gleichzeitige Bestimmung von Flußgeschwindigkeit und Hämatokrit.

Gesellschaft für Mikrozirkulation e.V., 9. Jahrestagung, Kurzmanuskripte, Berlin 89-95, 1985

LEY, K., ARFORS, K.-E.:

Segmental differences of microvascular permeability for FITC-dextran measured in the hamster cheek pouch.

Microvasc. Res. 31: 84-99, 1986

LINDBOM, L., TUMA, R.F., ARFORS, K.E.:

Influence of oxygen on perfused capillary density and capillary red cell velocity in rabbit skeletal muscle

Microvasc. Res. 19: 197-208, 1980

LINDBOM, L., TUMA, R.F., ARFORS, K.-E.:

Blood flow in the rabbit tenuissimus muscle. Influence of preparative procedures for intravital microscopic observations.

Acta Physiol. Scand. 114: 121-127, 1982

LINDBOM, L., ARFORS, K.E.:

Interrelationship between arteriolar blood flow distribution and capillary perfusion in skeletal muscle

Prog. appl. Microcirc. 5: 84-93, 1984

LINDBOM, L., TUMA R.F., ARFORS, K.-E.:

Blood flow in the rabbit tenuissimus muscle

Acta Physiol Scand 114: 121-127, 1982

LINDER, E.:

Measurements of normal and collateral coronary blood flow in dogs by ⁵⁸Krypton
and ¹⁵³Xenon.

Acta physiol. scand. 68, 272: 5-14, 1966

LINDGREN, A.G.H.:

The vascular supply of tumors with special references to the capillary angioarchitecture.

Acta path. microbiol. scand. 22: 433-452, 1945

LIPOWSKY, H.H., ZWEIFACH, B.W.:

Methods for the simultaneous measurement of pressure differentials and flow in single unbranched vessels of the microcirculation for rheological studies.

Microvasc. Res. 14: 345-361, 1977

LIPOWSKY, H.H., ZWEIFACH, B.W.:

Application of the "two-slit" photometric technique to the measurement of microvascular volumetric flow rates.

Microvasc. Res. 15: 93-101, 1978

LIPOWSKY, H.H., USAMI, S., CHIEN, S.:

In vivo measurement of "apparent viscosity" and microvessel hematocrit in the mesentery of the cat.

Microvasc. Res. 19: 297-319, 1980

LIPOWSKY, H.H.:

Determinants of microvascular blood flow.

Physiologist 25: 357-372, 1982

LONGNECKER, D.E., HARRIS, P.D.:

Anesthesia.

In: Kaley, G., Altura, B.M. (Eds.): "Microcirculation", Vol. III, pp. 333-369,

Univ. Park Press, 1980a

LONGNECKER, D.E., HARRIS, P.D.:

Microcirculatory actions of general anesthetics.

Fed. Proc. 39: 1580-1583, 1980b

LONGNECKER, D.E., ROSS, D., SILVER, I:

Anesthetic influence on arteriolar diameters and tissue oxygen tension in hemorrhaged rats.

Anesthesiology 57: 177-182, 1982

LONGNECKER, D.E.:

Effects of general anesthetics on the microcirculation

Microcirc. Endo. Lymph. 1: 129-150, 1984

LUEBBERS, D.W.:

Principle of construction and application of various platinum electrodes.

Prog. Respir. Res. 3: 136-146, 1969

LUEBBERS, D.W.:

Local tissue PO_2 : Its measurement and meaning.

In: Kessler, M., Bruley, D.F., Clark, L.C., Luebbbers, D.W., Silver, I.A., Strauss, J. (Eds.): "Oxygen Supply", pp. 151-155, Urban Schwarzenberg, München,

Berlin, Vienna, 1973

LUEBBERS, D.W.:

Exchange processes in the microcirculatory bed.

In: Meesen, H. (Hrsg.): "Handbuch der allgemeinen Pathologie, III/7, Mikrozirkulation", S. 411-476, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1977a

LUEBBERS, D.W.:

Die Bedeutung des lokalen Gewebesauerstoffdruckes und des pO_2 -Histogramms für die Beurteilung der Sauerstoffversorgung eines Organs.

Prakt. Anaesth. 12: 184-201, 1977b

LUND, N.:

Studies on skeletal muscle surface oxygen pressure fields.

Med. Diss. No. 71, Linköping, Sweden, 1979

LUTZ, B.R., FULTON, G.P., PLATT, D.L., HANDLER, A.H.:

The growth rate of tumor transplants in the cheek pouch of the hamster (*Mesocricetus auratus*).

Cancer Res. 10: 231-237, 1950a

LUTZ, B.R., PLATT, D.L., HANDLER, A.H. STEVENS, D.F.:

Serial sarcoma transplantation in the hamster cheek pouch and the effects of advanced neoplasia on the small blood vessels.

Anat. Rec. 108: 545-559, 1950b

MAEDA, H., MATSUMOTO, T., KONNO, T., IWAI, K., UEDA, M.:

Tailor making of protein drugs by polymer conjugation for tumor targeting: a brief review on smancs.

J. Protein Chem. 3: 181-193, 1984

MÄNTYLÄ, M.J., TOIVANEN, J.T., PITKÄNEN, M.A., REKONEN, A.H.:

Radiation-induced changes in regional blood flow in human tumors.

Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 8: 1711-1717, 1982

MAJNO, G.:

Ultrastructure of the vascular system.

In: Hamilton, W.F., Dow, Ph. (Eds.): "Handbook of Physiology", II/3, pp. 2293-2375, Am. Physiol. Soc., Washington D.C., 1965

MARTZ., G.:

Heutige Stellung und Besonderheiten der internistischen Krebstherapie.

In: Brunner, K.W. und Nagel, G.A. (Hrsg.): "Internistische Krebstherapie", S. 3-16, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo, 1985

MATSUMURA, Y., MAEDA, H.:

A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: Mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. Cancer Res. 46: 6387-6392, 1986

MATTSON, J., APPELGREN, L., HAMBERGER, B., PETERSON, H.I.:

Tumor vessel innervation and influence of vasoactive drugs on tumor blood flow.

In: Peterson, H.I. (Ed.): "Tumor Blood Circulation", pp. 129-135, CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, 1979

MATTSSON, J., ALPSTEN, M., APPELGREN, L., PETERSON, H.I.:

Influence of noradrenaline on local tumor blood flow.

Eur. J. Cancer 16: 99-102, 1980

MATTSSON, J., LILJA, J., PETERSON, H.I.:

Influence of vasoactive drugs on local tumor blood flow.

Eur. J. Cancer Clin. Oncol. 18: 677-684, 1982

McFARREN, E.F., LISHKA, T.R.J., PARKER, J.H.:

Criterion for judging acceptability of analytical methods.

Analyt. Chem. 42: 358-365, 1970

McNEIL, D.R.:

Interactive data analysis.

John Wiley & Sons, New York, 1977

MEESEN, H.:

In: Meesen, H. (Hrsg.): "Handbuch der allgemeinen Pathologie, III/7, Mikrozirkulation",

Vorwort, Springer, Berlin-Heidelberg-New York, 1977

MESSMER, K.:

Hemodilution

Surg. Clin. North Am. 55: 659-678, 1975

MESSMER, K., FUNK, W., ENDRICH, B., ZEINTL, H.:

The perspectives of new methods in microcirculation research.

Progr. appl. Micorcirc. 6: 77-90, 1984

MILLIKAN, G.A.:

Experiments on muscle haemoglobin in vivo; the instantaneous measurement of muscle metabolism.

Proc. Soc. Lond. (Biol.) 123: 218-241, 1937

MISHINA, H., ASAKURA, T., NAGAI, S.:

A laser Doppler microscope.

Opt. Commun. 11: 99-102, 1974

MONRO, P.A. G.:

A method for measuring the velocity of moving particles under the microscope.

In: Borer, R., Cosslet, V.E. (Eds.): "Advances in Optical and Electron Microscopy", pp. 1-40, Academic, New York, 1966

MÜLLER, H.K., ZAHN, R.:

Die gleichzeitige Messung von Hämatokrit, Erythrozytenzahl und -geschwindigkeit am natürlichen durchströmten Einzelgefäß.

Pflügers Arch. ges. Physiol. 266: 668-671, 1958

MÜLLER-KLIESER, W., VAUPEL, P., MANZ, R., GRUNEWALD, W.A.:

Intracapillary oxyhemoglobin saturation in malignant tumors with central or peripheral blood supply.

Eur. J. Cancer 16: 195-201, 1980

MÜLLER-KLIESER, W., VAUPEL, P., MANZ, R., SCHMIDSEDER, R.:

Intracapillary oxyhemoglobin saturation of malignant tumors in humans.

Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 7: 1397-1404, 1981

MÜLLER-KLIESER, W., VAUPEL, P.:

Die Sauerstoffversorgung maligner Tumoren als kritischer Parameter der Therapie.

Mikrozirk. Forsch. Klin. 2: 91-106, 1983

NAKAMURA, Y., WAYLAND, H.:

Macromolecular transport in the cat mesentery.

Microvasc. Res. 9: 1-21, 1975

NIMS, J.C., IRWIN, J.W.:

Chamber technique to study the microvasculature.

Microvasc. Res. 5: 105-118, 1973

NUGENT, L.J., JAIN, R.K.:

Plasma pharmacokinetics and interstitial diffusion of macromolecules in a capillary bed.

Am. J. Physiol. 246: H129-H137, 1984

NYLANDER, E., LUND, N., WRANNE, B.:

Effect of increased blood oxygen affinity on skeletal muscle surface oxygen pressure fields.

J. Appl. Physiol. 54: 99-104, 1983

O'BRIEN, J.J.JR., LUCEY, E.C., SNIDER G.L.:

Arterial blood gases in normal hamsters at rest and during exercise.

J. Appl. Physiol.: 46: 806-810, 1979

ODA, T., ENDRICH, B., GOETZ, A., MEGMER, K.:

Gefäßveränderungen während des Tumorwachstums.

Fortschr. Med. 100: 1887-1930, 1982

O'DONOGHUE, M.N., ZAREM, H.A.:

Stimulation of neovascularization - Comparative efficacy of fresh and preserved skin grafts.

Plast. Reconstr. Surg. 48: 474-478, 1971

O'FLAHERTY, J.T., WARD, P.A.:

Chemotactic factors and the neutrophil.

Sem. Hematol. 16: 163-174, 1979

OLSSON, Y., SVENSJÖ, E., ARFORS K.E., HULTSTRÖM D.:

Fluorescein labelled dextrans as tracers for vascular permeability studies in the nervous system.

Acta Neuropathol. 33: 45-50, 1975

PAPENFUSS, H.D., GROSS, J.F., INTAGLIETTA, M., TREESE, F.A.:

A transparent access chamber for the rat dorsal skin fold.

Microvasc. Res. 18: 311-318, 1979

PEREIRA, W.JR., O'BRIEN, J., SNIDER, G.L.:

Arterial Blood gases in awake normal and emphysematous hamsters (Abstr.).
Clin. Res. 25:421A, 1977

PETERS, W., TEIXEIRA, M., INTAGLIETTA, M., GROSS, J.F.:

Microcirculatory studies in rat mammary carcinoma. I. Transparent chamber method, development of microcirculation, and pressures in tumor vessels.
J. Natl. Cancer Inst. 65: 631-642, 1980

PETERSON, H.I., APPELGREN, K.L., RUDENSTAM, G.M.:

Studies on the circulation of experimental tumors. I. Effect of induced fibrinolysis and antifibrinolysis on capillary blood flow and the capillary transport function of two experimental tumors in the mouse.
Eur. J. Cancer 5: 91-97, 1969

PETERSON, H.I., APPELGREN, L., LUNDBORG, G., ROSENGREN, B.:

Capillary permeability of two transplantable rat tumours as compared with various normal organs of the rat.
Bibl. Anat. 12: 511-518, 1973

PETERSON, H.I.:

Vascular and Extravascular spaces in Tumors: Tumor vascular permeability.
in: Peterson, H.I. (Ed.): "Tumor Blood Circulation", pp. 49-75, CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, 1979a

PETERSON, H.I.:

Tumor blood flow compared with normal tissue blood flow.
In: Peterson, H.I. (Ed.): "Tumor Blood Circulation", pp. 103-113, CRC Press, Boca Raton, Florida/USA, 1979b

POPPER, C., CHIUEH, C., KOPIN, I.:

Plasma catecholamine concentrations in unanesthetized rats during sleep, wakefulness, immobilization and after decapitation.

J. Pharmacol. Exp. Ther. 202: 144-148, 1977

POPOVIC, V., POPOVIC, P.:

Permanent cannulation of aorta and vena cava in rats and ground squirrels.

J. Appl. Physiol. 15: 727-728, 1960

PREWITT, R.L., JOHNSON, P.C.:

The effect of oxygen on arteriolar red cell velocity and capillary density in the rat cremaster muscle.

Microvasc. Res. 12: 59-70, 1976

PRIES, A.R., KANZOW, G., GEAHTGENS, P.:

Improvement and calibration of a method for determination of microvessel hematocrit.

Bibl. Anat. 20: 24-27, 1981

PROFIO, A.E., DOIRON, D.R., BALCHUM, O.JL, HUTH, G.C.:

Fluorescence bronchoscopy for localization of carcinoma in situ.

Med. Phys. 10: 35, 1983

REINHOLD, H.S.:

Improved microcirculation in irradiated tumors.

European J. Cancer 7: 273-280, 1971

REINHOLD, H.S., BLACHIWIECZ, B., BLOK, A.:

Oxygenation and reoxygenation in "sandwich" tumors.

Bibl. Anat. 15: 270-272, 1977

REINHOLD, H.S.:

In vivo observations of tumor blood flow.

In: Petersen, H.L. (Ed.): "Tumor Blood Circulation" pp. 115-127, CRC Press,
Boca Raton, Florida/USA, 1979

RENKIN, E.M., GRAY, S.D., DODD, L.R.:

Filling of microcirculation in skeletal muscle during timed India ink perfusion.

Am. J. Physiol. 241: H174-H186, 1981

RHODIN, J.A.G.:

The ultrastructure of mammalian arterioles and precapillary sphincters.

J. Ultrastruct. Res. 18: 181-223, 1967

RHODIN, J.A.G.:

Ultrastructure of mammalian venous capillaries, venules and small collecting
veins.

J. Ultrastruct. Res. 25: 452-500, 1968

RIBBERT, H.:

Über das Gefäß-System und die Heilbarkeit der Geschwülste.

Dtsch. Med. Wochenschr. 30: 801-803, 1904

RICHARDSON, D.R.:

Pressures and velocities of blood flow.

In: Kaley, G., Altura, B.M., (Eds.): "Microcirculation", Vol. III, pp. 373-392,
University Park Press, Baltimore, 1980

ROBERT, J., MARTIN, J., BURG, C.:

Evolution de la vascularisation d'une tumeur isologue solide de la souris au
cours de sa croissance.

Strahlentherapie 133: 621-630, 1967

RÖCKEMANN, W.:

Bestimmung der Stromstärke in kleinen Gefäßen mit geschichteter Strömung aus der Bewegung des Erythrozytenbildes.

Arch. Kreisl. Forsch. 67: 223-232, 1972

RÖCKEMANN, W. PLESSE, G.J.:

Registration of erythrocyte velocity by selecting wavelength and superposition of oscillations.

Bibl. Anat. 11: 50-54, 1973

ROGERS, W., EDLICH, R.F., LEWIS, D.V.:

Tumor blood flow. I. Blood flow in transplantable tumors during growth. Surg. Clin. North Am. 47: 1473-1482, 1967

ROGERS, W., EDLICH, R.F., AUST, J.B.:

Tumor blood flow. II. Distribution of blood flow in experimental tumors. Angiology 20: 374-387, 1969

ROSENBLUM, W.I., EL-SABBAN, F.:

Platelet aggregation in the cerebral microcirculation: Effect of aspirin and other agents.

Circ. Res. 40: 320-328, 1977

RUBIN, P., CASARETT, G.:

Microcirculation of tumors. I. Anatomy function and necrosis. Clin. Radiol. 17: 220-229, 1966

RUDOLPH, A.M., HEYMANN, M.A.:

The circulation of the fetus in utero.

Circ. Res. 21: 163, 1967

RUTILI, G., ARFORS, K.E.:

Technical Report: Fluorescein-labelled dextran measurement in interstitial fluid in studies of macromolecular permeability.

Microvasc. Res. 12: 221-230, 1976

RUTILI, G.:

Transport of macromolecules in subcutaneous tissue studied by FITC-dextran.

Doctoral Dissertation (Abstr.), Faculty of Medicine, Univ. of Upsala

SACHS, L.:

Angewandte Statistik: statistische Methoden und ihre Anwendungen.

Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 6. Auflage, 1984

SANDERS, A.G.:

Microcirculation in grafts of normal and malignant tissue.

J. Anat. 97: 631-632, 1963

SANDERS, A.G. SHUBIK, P.:

A transparent window for use in the Syrian Hamster.

Isr. J. Exp. Med. 11: 118, 1964

SANDISON, J.C.:

A new method for the microscopic study of living growing tissues by the introduction of a transparent chamber in the rabbit's ear.

Anat. Rec. 28: 281-287, 1924

SANDISON, J.C.:

Observations on growth of blood vessels as seen in transparent chamber introduced into rabbit's ear.

Am. J. Anat. 41: 475 - 496, 1928a

SANDISON, J.C.:

The transparent chamber of the rabbit's ear, giving a complete description of improved technic of construction and introduction, and general account of growth and behavior of living cells and tissues as seen with the microscope.

Amer. J. Anat. 41: 447-473, 1928b

SANDRITTER, W.:

Allgemeine Pathologie: Lehrbuch für Studierende u. Ärzte.
Schattauer, Stuttgart, New York, 1981

SAPIRSTEIN, L.A.:

Regional blood flow by fractional distribution of indicators.

Am. J. Physiol. 193: 161-169, 1958

SAPIRSTEIN, L.A., MOSES, L.E.:

Cerebral and cephalic blood flow in man: basic considerations of the indicator-fractionation technique.

In: "Dynamic clinic studies with radioisotopes", pp. 135-147, Report U.S. Atomic Energy Commission, Washington, D.C., 1964

SARELIUS, I.H., DULING, B.R.

Direct measurement of microvessel hematocrit, red cell flux, velocity and transit time.

Am. J. Physiol. 243: H1018-H1026, 1982

SARELIUS, I.H., MC'KINLAY, S.M.:

Statistical constraints on microvascular measurements using fluorescent erythrocytes.

Am. J. Physiol. 248: H577-H586, 1985

SARELIUS, I.H.:

Cell flow path influences transit time through striated muscle capillaries.

Am. J. Physiol. 250: H899-H907, 1986

SCHEID, P.:

Funktionelle Besonderheiten der Mikrozirkulation im Karzinom.

Bibl. anat. 1: 327-335, 1961

SCHMID-SCHOENBEIN, G.W., ZWEIFACH, B.W.:

RBC-velocity profiles in arterioles and venules of the rabbit omentum.

Microvasc. Res. 10: 153-164, 1975

SCHMID-SCHÖNBEIN, G.W., ZWEIFACH, B.W., KOVALCHECK, S.:

The application of stereological principles to morphometry of the microcirculation in different tissues.

Microvasc. Res. 14: 303-317, 1977

SCHMID-SCHÖNBEIN, H.:

Micro rheology of erythrocytes and thrombocytes, blood viscosity and the distribution of blood flow in the microcirculation.

In: Meesen, H. (Hrsg.): "Handbuch der Allgemeinen Pathologie III/7, Mikrozirkulation, S. 289-384 Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1977

SCHOEFL, G.I.:

Studies on inflammation. III. Growing capillaries: Their structure and permeability.

Virchows Arch. (Pathol. Anat.) 337: 97-141, 1963

SCHÖNLEBEN, K., HAUSS, J., SPIEGEL, U., BÜNTE, H., KESSLER, M.:

Monitoring of tissue PO_2 in patients during intensive care.

In: Silver, J.A., Erecinska, M., Bicher, H.J. (Eds.): "Oxygen Transport to Tissue", pp. 593-597, Plenum Press, New York, 1978

SENN, H.J.:

Indikationen, Erfolgsaussichten und praktische Durchführung der internistischen Krebstherapie.

In: Brunner, K.W. und Nagel, G.A. (Hrsg.): "Internistische Krebstherapie", S. 93-117, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo, 1985

SEWELL, I.A.:

Studies of the microcirculation using transparent tissue observation chambers inserted in the hamster cheek pouch.

J. Anat. 100: 839-856, 1966.

SHUBIK, P.:

Vascularization of tumors: a review.

J. Cancer Res. Clin. Oncol. 103: 211-226, 1982

SILVERMAN, N.R., INTAGLIETTA, M., SIMON, A.L., TOMPKINS, W.R.:

Determination of pulmonary pulsatile perfusion by fluoroscopic videodensitometry.

J. Appl. Physiol. 33: 147-149, 1972

SLAAF, D.W., ROOD, J.P.S.M., TANGELDER, G.J., ARTS, T.:

A bi-directional optical system for on-line red blood cell velocity measurements.

Microvasc. Res. 17: S173, 1979

SLAAF, D.W., ROOD, J.P.S.M., TANGELDER, G.J., JEURENS, T.J.M., ALEWIJNSE, R., RENEMAN, R.S., ARTS, T.:

A bi-directional optical (BDO) three stage prism grating system for on-line measurement of red blood cell velocity in microvessels.

Microvasc. Res. 22: 110-122, 1981

SLAAF, D.W., ARTS, T., JEURENS, T.J.M., TANGELDER, G.J., RENEMAN, R.S.:
Electronic measurement of red blood cell velocity and volume flow in microves-
sels.

Invest. Microtech., Med. Biol. 1: 327-364, 1984

SMIRNOV, N.:

Tables for estimating the goodness of fit of empirical distributions.

Ann. Math. Statist. 19: 279-281, 1948

SMITH, G.M.:

The effect of cytotoxic agents on human tumours transplanted to the hamster
cheek pouch.

Br. J. Cancer 23: 78-87, 1969

SMITH, T.L., OSBORNE, S.W., HUTCHINS, P.M.:

Long-term micro- and macrocirculatory measurements in conscious rats.

Microvasc. Res. 29: 360-370, 1985.

SMITH, W.J.:

Modern Optical Engineering, McGraw-Hill, New York, 1966

SPAET, T.H., LEJNIEKS, I.:

Mitotic activity of rabbit blood vessels.

Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 125: 1197-1201, 1967

STAINSBY, W.N. OTIS, A.B.:

Blood flow, blood oxygen tension, oxygen uptake, and oxygen transport in skele-
tal muscle.

Am. J. Physiol. 206: 858-866, 1964

STROIA, L.N., BOHR, D.F., VOCKE, L.:

Experimental hypertension in the hamster.

Am. J. Physiol. 179: 154-158, 1954

SUTHERLAND, R.M., FRANKO, A.J.:

On the nature of the radiobiologically hypoxic fraction in tumors.

Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 6: 117-120, 1980

SVENSJÖ, E., PERSSON, C.G.A., RUTILI, G.:

Inhibition of bradykinin induced macromolecular leakage from post-capillary venules by a β_2 -adrenoreceptor stimulant, terbutaline.

Acta Physiol. Scand. 101: 504-506, 1977

SVENSJÖ, E., ARFORS, K.E., ARTURSON, G., RUTILI, G.:

The hamster cheek pouch preparation as a model for studies of macromolecular permeability of the microvasculature.

Uppsala J. Med. Sci. 83: 71-79, 1978

SVENSJÖ, E., ARFORS, K.E., RAYMOND, R.M., GREGA, G.J.:

Morphological and physiological correlation of bradykinin-induced macromolecular efflux.

Amer. J. Physiol. 236: H600-H606, 1979

SWEENEY, T.E., SARELIUS, I.H.:

Use of flow cytometry to extend and improve in vivo determinations of microvessel hematocrit and cell flux.

Microvasc. Res. 31: 184-196, 1986

TANGELDER, G.J., SLAAF, D.W., RENEMAN, R.S.:

Fluorescent labeling of blood platelets in-vivo.

Thrombosis Res. 28: 803-820, 1982

TANNOCK, I.F.:

The relation between cell proliferation and the vascular system in a transplanted mouse mammary tumor.

Br. J. Cancer 22: 258-273, 1968

TANNOCK, J. F.:

Population kinetics of carcinoma cells, spillary endothelial cells and fibroblasts in a transplanted mouse mammary tumor.

Cancer Res. 30: 2470-2476, 1970

THIERSCH, C.:

Der Epithelialkrebs namentlich der Haut mit Atlas.

Leipzig, 1865

TOMPKINS, W.R., MONTI, R., INTAGLIETTA, M.:

Velocity measurement by self-tracking correlator.

Rev. Sci. Instrum 45: 647-649, 1974

TREVAN, D., YOUNG, S.:

Eight millimeter cine microscopy of a transparent chamber in the skin of the rat.

In: G. Bourne (Ed.): "In-vivo Techniques in Histology", pp. 181-191, Williams & Wilkins, Baltimore, 1967

TUCKEY, J.W.:

Exploratory data analysis.

Addison Wesley Publishing Company, Reading, Mass., 1977

ULRICH, S., HILPERT, P., BARTELS, H.:

Über die Atmungsfunktion des Blutes von Spitzmäusen, weißen Mäusen und syrischen Goldhamster.

Pflügers Arch. ges. Physiol. 277:150-165, 1963

UNDERWOOD, E.E.:

Quantitative Stereology.

Addison Wesley, Reading, Mass., 1970

UNDERWOOD, J.C., CARR, I.:

The ultrastructure and permeability characteristics of the blood vessels of a transplantable rat sarcoma.

J. Pathol. 107: 157-166, 1972

URBACH, F., NOELL, W.K.:

Effects of oxygen breathing on tumor oxygen measured polarographically.

J. Appl. Physiol. 13: 61-65, 1969

URBACH, F., GRAHAM, J.H.:

Anatomy of human skin tumor capillaries.

Nature (Lond.) 194: 652-654, 1962

URBACH, F.:

Anatomy and pathophysiology of skin tumor capillaries.

Natl. Cancer Inst. Monogr. 10: 539-559, 1963

VAN DEN BERG, A.P., WIKE-HOOLEY, J.L., VAN DEN BERG-BLOK, A.E.,

VAN DER ZEE, J., REINHOLD, H.S.:

Tumor pH in human mammary carcinoma.

Europ. J. Cancer Clin. Oncol. 18: 457-465, 1982

VAUPEL, P.:

Atemgaswechsel und Glucosestoffwechsel von Implantationstumoren (DS-Carcinosarkom) in vivo.

Steiner, Wiesbaden, 1974

VAUPEL, P.:

Effects of percentual water content in tissues and liquids on the diffusion coefficients of O_2 , CO_2 , N_2 and H_2 .

Pflügers Arch. 361: 201-204, 1976

VAUPEL, P.:

Hypoxia in neoplastic tissue.

Microvasc. Res. 13: 399-408, 1977

VAUPEL, P.:

Oxygen Supply to malignant tumors.

In: Peterson, H.I. (Ed.): "Tumor Blood Circulation", pp. 143-167, CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, 1979

VAUPEL, P., MANZ, R., MÜLLER-KLIESER, W., GRUNEWALD, W.A.:

Intracapillary HbO_2 saturation in malignant tumors during normoxia and hyperoxia.

Microvasc. Res. 17: 181-191, 1979

VAUPEL, P., FRINAK, S., BICHER, H.I.:

Heterogeneous oxygen partial pressure and pH distribution in C3H mouse mammary adenocarcinoma.

Cancer Res. 41: 2008-2013, 1981

VAUPEL, P..

Pathophysiologie der Durchblutung maligner Tumoren,

in: Thews, (Hrsg.): "Funktionsanalyse biologischer Systeme, pp. 1101-1116, Steiner, Wiesbaden, 1982

VAUPEL, P., MÜLLER-KLIESER, W.:

Interstitieller Raum und Mikromilieu in malignen Tumoren.

Mikrozirk. Forsch. Klin. 2: 78-90, 1983

VAUPEL, P., KALLINOWSKI, F.:

Hemoconcentration of Blood Flowing Through Human Tumor Xenografts.

10. Jahrestagung der Gesell. f. Mikrozirk. e.V., Kurzmanuskripte, S. 35-39, Heidelberg, 1986

VIRCHOW, R.:

Die krankhaften Geschwulste,
August Hirschwald, Berlin, 1863

VOGEL, H.:

Die Geschwindigkeit des Blutes in den Lungenkapillaren.
Helv. Physiol. Acta 5: 105-121, 1947

VOLKERT, W.A., MUSACCHIA, X.J.:

Blood gases in hamsters during hypothermia by exposure to He-O₂ mixture and cold.

Am. J. Physiol. 219: 919-922, 1970

WAHL, M., UNTERBERG, A., BAETHMANN, A.:

Intravital fluorescence microscopy for the study of blood-brain-barrier function.

Int. J. Microcirc. Clin. Exp. 4: 3-18, 1985

WARREN, B.A., SHUBIK, P.:

The growth of the blood supply to melanoma transplants in the hamster cheek pouch.

Lab. Invest. 15: 464-478, 1966

WARREN, B.A.:

In vivo and electron microscopic study of vessels in two transplantable tumours in the hamster.

Bibl. Anat. 9: 412-417, 1967

WARREN, B.A.:

The ultrastructure of the microcirculation at the advancing edge of Walker 256 carcinoma.

Microvasc. Res. 2: 443-453, 1970

WARREN, B.A.:

The microcirculation in two transplantable melanomas of the hamsters. II.
Scanning electron microscopy.
Cancer Lett. 4: 117-124, 1978a

WARREN, B.A.:

Metastasis via the blood stream: The method of intravasation of tumor cells in a
transplantable melanoma of the hamster.
Cancer Lett. 4: 245-251, 1978b

WARREN, B.A.:

The vascular morphology of tumors.
In: Peterson, H.I. (Ed.): "Tumor Blood Circulation", pp. 1-47, CRC Press, Inc.,
Boca Raton, Florida, 1979a

WARREN, B.A.:

Tumor Angiogenesis.
In: Peterson, H.I. (Ed.): "Tumor Blood Circulation", pp. 49-75, CRC Press, Inc.,
Boca Raton, Florida, 1979b

WATERS, H.G., GREEN, J.A.:

The vascular system of two transplantable mouse granulosa cell tumors,
Cancer Res. 19, 326, 1959

WAYLAND, H., JOHNSON, P.C.:

Erythrocyte velocity measurement in microvessels by a two-slit photometric
method.
J. appl. Physiol. 22: 333-337, 1967

WAYLAND, H.:

Photosensor methods of flow measurement in the microcirculation.
Microvasc. Res. 5: 336-350, 1973

WAYLAND, H.:

Intravital Microscopy

In: Barer, R., Cosslett, V.E. (Eds.): "Advances in Optical and electron microscopy", pp. 1-47, Academic Press, New York, 1975

WEISS, H.R., COHEN, J.A., McPHERSON, L.A.:

Blood flow and relative tissue pO_2 of brain and muscle. Effect of various gas mixtures.

Am. J. Physiol. 230: 839-844, 1976

WENNER, C.E.:

Regulation of energy metabolism in normal and tumor tissue.

In: Becker, F.F. (Ed.): "Cancer", Vol. 3, A comprehensive treatise, pp. 389-403, Plenum Press, New York, London, 1975

WHALEN, W.H., NAIR, P.:

Intracellular PO_2 and its regulation in resting skeletal muscle of the guinea pig.

Circ. Res. 21: 251-261, 1967

WHALEN, W.J., NAIR, P., BUERK, D., THUNING, C.A.:

Tissue pO_2 in normal and denervated cat skeletal muscle.

Am. J. Physiol. 227: 1221-1225, 1974

WIEDEMAN, M.P.:

Effect of venous flow on frequency of vasomotion in the bat wing.

Circulation 5: 641-644, 1957

WIEDERHIELM, C.A., WESTON, B.W.:

Microvascular, lymphatic, and tissue pressures in unanesthetized mammal.

Am. J. Physiol. 225: 992-996, 1973

WIIG, H., TVEIT, E., HULTBOR, R., REED, R.K., WEISS, L.:

Interstitial and vascular pressures in rat mammary tumours.

Bibl. Anat. 20: 620-623, 1981

WIIG, H., TVEIT, E., HULTBORN, R., REED, R.K., WEISS, L.:

Interstitial fluid pressure in DMBA-induced rat mammary tumors.

Scand. J. clin. Lab. Invest. 42: 159-164, 1982

WILLIAMS, R.G.:

The transparent chamber adapted for cell culture and permitting access to the contained living tissue.

Anat. Rec. 60: 487-491, 1934a

WILLIAMS, R.G.:

An adaptation of the transparent chamber technique to the skin of the body.

Anat. Rec. 60: 493-499, 1934b

WILLIAMS, R.G.:

The vascularity of normal and neoplastic grafts in vivo.

Cancer Res. 11: 139-144, 1951

WILLIAMS, R.G.:

Experiments on the growth of blood vessels in thin tissue and in small autografts.

Anat. Rec. 133: 465-485, 1959

WILLIAMS, R.G.:

The transparent chamber method as applied to rabbit ears.

In: G.H. Bourne (Ed.): "In-vivo Techniques in Histology", pp. 113-136, Williams & Wilkins, Baltimore, 1967

WILLIS, R.A.:

The spread of tumors in the human body.

Butterworth, London, 1973

WITTE, S., GOLDENBERG, D.M.:

Microcirculation in tumours and reaction to transplantation.

Bibl. Anat. 8: 396-402, 1967

WOOD, JR.S.:

Pathogenesis of metastasis formation observed in vivo in the rabbit ear chamber.

Arch. Path. 66: 550-568, 1958

YAMAURA, H., SUZUKI, M., SATO, H.:

Transparent chamber in the rat skin for studies on microcirculation in cancer tissue.

Gann 62: 177-185, 1971

YAMAURA, H., SATO, H.:

Quantitative studies on the developing vascular system of rat hepatoma.

J. Natl. Cancer Inst. 53: 1229-1240, 1974

YAMAURA, H., YAMADA, K., MATSUZAWA, T.:

Radiation effect on the proliferating capillaries in rat transparent chambers.

Radiat. Biol. 30: 179-187, 1976

ZANELLI, G.D., LUCAS, P.B., FOWLER, J.F.:

The effects of anaesthetics on blood perfusion in transplanted mouse tumors.

Br. J. Cancer 32: 380-384, 1975

ZANELLI, G.D., FOWLER, J.F.:

Anaesthetics in the study of the microcirculation of tumors: pitfalls and uses.

Bibl. anat. 15: 249-253, 1977.

ZIMMERHACKL, B., PAREKH, M., BRINKHUS, H., STEINHAUSEN, M.:

The use of fluorescent labelled erythrocytes for intravital investigation of flow and local hematocrit in glomerular capillaries in the rat.

Int. J. Microcirc. Clin. Exp. 2: 119-130, 1983

ZWEIFACH, B.W.:

Direct observation of the mesenteric circulation in experimental animals.

Anat. Res. 120: 277-287, 1954

ZWEIFACH, B.W., METZ, D.B.:

Selective distribution of blood through the terminal vascular bed of mesenteric structure and skeletal muscle.

Angiology 6: 282-294, 1955

ZWEIFACH, B.W.:

General principles governing the behavior of the microcirculation.

Am. J. Med. 23: 684, 1957

ZWEIFACH, B.W.:

Microvascular aspects of tissue injury.

In: Zweifach, B.W., Grant, L., McCluskey, R.T. (Eds.): "The Inflammatory Process", Vol. 2: pp. 3-46, Academic, New York, 1973

ZWEIFACH, B.W.:

Quantitative studies of microcirculatory structure and function. I. Analysis of pressure distribution in the terminal vascular bed in cat mesentery.

Circ. Res. 34: 843-857, 1974

ZWEIFACH, B.W.:

Perspectives in microcirculation.

In: G. Kaley, B.M. Altura, (Eds.): "Microcirculation", Vol. I, p. 1, University Park Press, Baltimore, 1977

ZWEIFACH, B.W., LIPOWSKY, H.H.:

Quantitative studies of the microcirculatory structure and function. III. Microvascular hemodynamics of cat mesentery and rabbit omentum.

Circ. Res. 41: 380-390, 1977

VIL. BISHER VERÖFFENTLICHTE TEILASPEKTE DER ARBEIT

Teile aus der vorliegenden Arbeit wurden als Originalia bzw. als Kurzpublikationen veröffentlicht.

Für die Entwicklung des experimentellen Modells wurde mir der **Harold-Lampert-Biomedical-Research-Award** der **European Society for Microcirculation** anlässlich der alle zwei Jahre stattfindenden Tagung dieser Gesellschaft verliehen.

Publikationsliste

ENDRICH B, ASAISHI K, GOETZ A, MESSMER K:

Technical report. A new chamber technique for microvascular studies in unaesthetized hamsters.

Res. Exp. Med. 177: 125-134, 1980

ENDRICH B, ASAISHI K, GOETZ A, MESSMER K:

Quantitative studies of microcirculatory function in the amelanotic melanoma A-Mel-3.

Europ. Surg. Res. 12: Suppl.1, 125-126, 1980

ENDRICH B, ASAISHI K, GOETZ A, MESSMER K:

The amelanotic hamster melanoma A-Mel-3: A model for quantitative microvascular analysis.

Europ. Surg. Res. 12: Suppl. 2, 12-13, 1980

GOETZ A, ENDRICH B, LAPRELL C, MESSMER K:

An experimental model for prolonged studies of the microcirculation.

Bibl. Anat. 20: 65-68, 1981

ASAISHI K, ENDRICH B, GOETZ A, MESSMER K:

Quantitative analysis of microvascular structure and function in the amelanotic melanoma A-Mel-3.

Cancer Res. 41: 1898-1905, 1981

ENDRICH B, ASAISHI K, GOETZ A, MESSMER K:

The hamster melanoma A-Mel-3 as a model for evaluation of cancer therapy?

Bibl. Anat. 20: 606-609, 1981

ENDRICH B, HAMMERSEN F, GOETZ A, MESSMER K:

Local pO_2 , microvascular hemodynamics and capillary morphology in the amelanotic melanoma A-Mel-3 of the hamster.

Eur. Surg. Res. 13: Suppl. 1, 29, 1981

ENDRICH B, GOETZ A, MESSMER K:

Quantitative Mikrozirkulationsuntersuchungen im amelanotischen Melanom A-Mel-3 des Hamsters.

Langenbecks Arch. Chir. Suppl. Chir. Forum, 217-221, 1981

ENDRICH B, GOETZ A, MESSMER K:

Distribution of microflow and oxygen tension in hamster melanoma.

Int. J. Microcirc. clin Exp. 1: 81-99, 1982

ENDRICH B, HAMMERSEN F, GOETZ A, MESSMER K:

Microcirculatory blood flow, capillary morphology and local oxygen pressure of the hamster amelanotic melanoma A-Mel-3.

J. Natl. Cancer Inst. 68: 475-485, 1982

ODA T, ENDRICH B, GOETZ A, MESSMER K:

Gefäßveränderungen während des Tumorwachstums.

Fortschr. Med. 100: 1887-1930, 1982

ENDRICH B, HAMMERSEN F, **GOETZ A**, MESSMER K:

Neovascularization and capillary flow in the amelanotic melanoma A-Mel-3 of the hamster.

Microvasc. Res. 26: 167, 1983

GOETZ A, FEYH J, SCHNECKENBURGER H, CONZEN P, JOCHAM D, UNSOELD E:

Quantitative in-vivo measurement of Photofrin II in tumor- and tumorfree tissue.

in: G. Jori and C. Perria (Eds.): "Photodynamic therapy of tumors and other diseases" 405-408 (Libreria Progetto Editore, Padova, 1985)

GOETZ A, SCHNECKENBURGER H, FEYH J, CONZEN P, BRENDDEL W:
Zeitaufgelöste Laserfluoreszenzmikroskopie von Hämatoporphyrin-Derivat (HpD)

zur Lokalisation an Organoberflächen gelegener Tumore.

Langenbecks Arch. Chir. Suppl. Chir. Forum, 337-341, 1986

GOETZ A, FEYH J, ORTNER H, CONZEN P, BRENDDEL W:

Digital on-line subtraction on videomicroscopic images for detection of hematoporphyrin-derivative fluorescence.

Int. J. Microcirc. Clin. Exp. 6, 71, 1987

VIII. ABSCHLIESSENDE BEMERKUNGEN

Die vorliegende experimentelle Arbeit wurde am Institut für chirurgische Forschung der Ludwig-Maximilians-Universität München (Direktor: Prof. Dr. Dr. h.c. W. Brendel) in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Konrad Meßmer (Ärztlicher Direktor der Abteilung für experimentelle Chirurgie der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg) unter Betreuung seines damaligen Assistenten Dr. med. B. Endrich begonnen und nach deren Weggang im Mikrozirkulationslabor unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. W. Brendel fortgesetzt und beendet.

Nach Beendigung dieser experimentellen Arbeit gilt mein besonderer Dank:

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. W. Brendel, meinem Chef, für das in mich gesetzte Vertrauen und für die Möglichkeit nach meinem Studienabschluß die experimentellen Arbeiten fortsetzen und als wissenschaftlicher Assistent unter seiner Leitung arbeiten zu dürfen. Seine lebensfreudige und stets kooperative Einstellung prägen die Atmosphäre und den Arbeitsgeist in unserem Institut und waren mir Motivation zu einer experimentellen wissenschaftlichen Tätigkeit. Sein unerschöpflicher Ideenreichtum und seine kritische Förderung des kreativen wissenschaftlichen "Spieltriebs" sind mir stets Ansporn und Vorbild.

Herrn Prof. Dr. K. Meßmer, der mich vor seiner Berufung zum Ärztlichen Direktor des Instituts für experimentelle Chirurgie der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg in sein Team aufnahm und dem ich meine ersten experimentellen Schritte verdanke. Er hat in mir Begeisterung und Engagement für die Mikrozirkulation geweckt und auch den Geist der Arbeit ("niemals aufgeben") bestimmt. Seine Betreuung und Hilfe bei der Durchführung der initialen Experimente selbst bis in die nächtlichen Stunden hinein werden mir immer in Erinnerung bleiben und Maßstab sein. Ich hoffe, mit der Weiterführung seines Mikrozirkulationslabors den gesetzten Anforderungen gerecht zu werden.

Herrn Dr. med. habil., Dr. med. B. Endrich für die Einarbeitung in mikrozirkulatorische Meßmethoden und die Betreuung bei der experimentellen Durchführung der Arbeit im ersten Jahr.

Herrn Prof. Dr. med. F. Hammersen (Direktor des anatomischen Instituts der Technischen Universität) und seinen Mitarbeitern für die Erstellung der histologischen und elektronenmikroskopischen Schnitte und für die genaue und kritische Befundung, sowie für den zeitlichen Aufwand mit mir die Ergebnisse zu diskutieren.

Herrn Prof. Dr. C. Hammer für die Überlassung der Tumorzellen, sowie Frau Herta Striegl und Herrn Olaf Ganghoff für die Hilfe bei der Tierpassage der Tumorzellen.

Dem Mitassistenten Dr. Peter Conzen für seine freundschaftliche Zusammenarbeit und für seine Unterstützung bei allen auftretenden Problemen.

Den medizinisch technischen Assistentinnen Frl. Andrea Kreisle und Frl. Anne Holzer, sowie dem EDV-Techniker Herrn Franz Förtsch, ohne deren aufopferungsvolle Hilfe bei der Durchführung der Experimente und bei der Erstellung der Abbildungen die Arbeit kaum durchführbar gewesen wäre.

Frl. Claudia Dautermann und Frau Christa Chaudry für die äußerst engagierte Unterstützung beim Schreiben der Dissertation und bei Korrekturarbeiten.

Meinen Mitdoktoranden Frau Dr. Christine Laprell und Dr. Lucho Rios-Nogales Garces, dem Humboldt-Stipendiaten Dr. Kazuaki Asaishi und den Doktoranden Richard Berger und Wolfgang Lumper für ihre freundschaftliche Unterstützung bei der experimentellen Durchführung..

Für die hilfreiche Beratung in statistischen Fragen Herrn P. Dirschedl (Inst. für Med. Informationsverarbeitung, Statistik und Biomathematik).

Herrn Prof. Dr. D.W. Lübbers (Direktor des Max-Planck-Institutes für System-Physiologie, Dortmund) und Frau Prof. Dr. Leniger-Follert (Max-Planck-Institut für System-Physiologie) für die Überlassung eines im Rahmen der Förderung der Deutschen Forschungsgemeinschaft entwickelten und von der Max-Planck-Gesellschaft finanzierten pO_2 -Meßplatzes.

Herrn Prof. Dr. M. Kessler (Direktor des II. Physiologischen Institutes der Universität Erlangen) und all seinen Mitarbeitern für den Bau von pO_2 -Elektroden und die Überlassung der Software für den computerisierten pO_2 -Meßplatz.

Allen Mitarbeitern des Instituts für die freundliche Aufnahme im Institut und für das immer angenehme und anregende Arbeitsklima.

Dem Staatsministerium des Inneren, vertreten durch Herrn Ministerialdirigent Dr. Drausnik, für die finanzielle Unterstützung während meines Studiums und für die Möglichkeit, trotz meiner initialen vertraglichen Bindungen an den höheren öffentlichen Gesundheitsdienst, eine wissenschaftliche Tätigkeit am Institut für Chirurgische Forschung zu beginnen.

IX. LEBENSLAUF

Alwin Eduard Goetz

Geburtsdatum/-ort: 9. April 1955 in Bayreuth, Bayern

Eltern: Eheleute Margarethe Sybilla, geb. Eichenmüller und
Albin Konrad Goetz, Schneidermeister

Schulausbildung: 1961-1965 Besuch der Volksschule in Neuzirkendorf
1965-1974 Besuch des mathematisch-naturwissen-
schaftlichen Gymnasiums in Eschenbach/Oberpfalz

Schulabschluß: Abitur am 21. 6. 1974

Grundwehrdienst: 1.7.1974 - 30.9.1975 bei der Sanitätstruppe der
Bundeswehr

Studium: WS 1975/76: 1 Semester Studium der Chemie an
der Universität Regensburg
1976-1982: Studium der Humanmedizin an der
Ludwig-Maximilians-Universität München. Im letzten Stu-
dienjahr Ableistung des Praktischen Jahres an der Chirur-
gischen Klinik (Leitung: Prof. Dr. Heberer) und dem Insti-
tut für Anaesthesiologie (Leitung: Prof. Dr. Peter) des
Klinikums Großhadern der Ludwig-Maximilians-Universität
München und an der 5. Med. Abt. d. Städt. Krankenhauses
München-Schwabing (Leitung: Prof. Dr. Kaess)

Studienabschluß: April 1982

Approbation: Mai 1982

Berufliche Tätigkeit: Seit 1.6.1982 wissenschaftlicher Assistent am Institut für chirurgische Forschung der Ludwig-Maximilians-Universität München (Leitung: Prof. Dr. Dr. h.c. W. Brendel), sowie Nacht- und Wochenenddienste an der Chirurgischen Klinik und Poliklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München, Innenstadt-kliniken (Leitung: Prof. Dr. L. Schweiberer)

Preise und

- Auszeichnungen:
- Sept. 1980: "Dr. Harold Larnport Biomedical Research Prize of the European Society for Microcirculation", verliehen durch die Europäische Gesellschaft für Mikrozirkulation, für die Arbeit: "An experimental model for prolonged studies in the microcirculation"
 - Sept. 1984: 1. Posterpreis beim Deutschen Anaesthesiekongress 1984, verliehen durch die Dt. Ges. für Anaesthesiologie und Intensivmedizin, für die Arbeit: "Prostaglandinfreisetzung aus der Lunge durch alveoläre Hypoxie"
 - Sept. 1985: 1. Posterpreis beim Zentraleuropäischen Anaesthesiekongress 1985 in Graz für die Arbeit: "Direkte Messungen mikrochämodynamischer Parameter in der Lungenstrombahn bei positiven alveolären Drucken"
 - Juni 1986: "Travel-Award of the European Society for Microcirculation", verliehen durch die Europäische Gesellschaft für Mikrozirkulation, für die Arbeit: "Direct measurement of arteriolar vasoconstriction during aveolar hypoxia"
 - Juli 1987: Otto Goetze-Preis anlässlich der Tagung der Vereinigung der Bay. Chirurgen für die Arbeit: "Experimentelle Tumorthherapie mit Stoßwellen - Erste Ergebnisse"
 - Sept. 1987 " Sony Award for Neurosurgical Videos" anlässlich des 8th European Congress of Neurosurgery für das Video: "Microcirculation of the rat brain surface" (gem. m. L. Schürer et al.)

